

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



VARIACIONES NUCLEOTÍDICAS DEL GEN DE *MIOSTATINA* EN GANADO BOVINO DE PROPOSITO CARNICO

Por

VICTOR RICARDO MORENO MEDINA

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
Con especialidad en
BIOTECNOLOGÍA**

Marzo, 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**VARIACIONES NUCLEOTÍDICAS DEL GEN DE *MIOSTATINA* EN GANADO
BOVINO DE PROPOSITO CARNICO**

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con especialidad en Biotecnología**

Presenta

VICTOR RICARDO MORENO MEDINA

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Benito Pereyra Alférez
Director de Tesis

Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas
Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal

Dra. Ana María Sifuentes Rincón
Asesor Externo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benito Pereyra Alferez por sus recomendaciones, paciencia y amistad.

A la Dra. Ana María Sífuentes Rincón, por su dirección, paciencia y amistad.

Al Instituto de Biotecnología de la UANL y personal Administrativo, por las atenciones y facilidades prestadas.

Al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional y a su personal Administrativo por las facilidades prestadas.

A la comisión revisora de tesis, Dr. Benito Pereyra Alferez, Dra. Ana María Sifuentes Rincón, Dr. Luís J. Galán Wong, Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas, Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, Dr. Juan Francisco Contreras Cordero.

A la Dra. Diana Resendez, Dra. Julia Verde Star, por su paciencia y apoyo administrativo.

Al Dr. Javier Rosales Alday, INIFAP- Aldama, por la información y facilidades prestadas.

Al Ing. Adolfo Treviño por las facilidades prestadas.

Al CONACYT que por medio del Instituto de Biotecnología de la UANL nos otorgó apoyo económico para la realización de éste trabajo.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 4 del
*Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias
Biológicas UANL y el Laboratorio de Biotecnología
Animal I del &Centro de Biotecnología Genómica
del IPN, bajo la dirección de la &Dra. Ana María
Sifuentes-Rincón y *Dr. Benito Pereyra alferez

DEDICATORIA

A Dios

A María Moreno†, María Silva†,

A Silvia, Gilberto, Ricardo, V. Hugo

A Ciro & Eustolia

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SIMBOLOS Y NOMENCLATURA	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	4
3. OBJETIVOS	5
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. ANTECEDENTES	7

4.1 La ganadería en México	7
4.2 Las razas de bovinos de carne	8
4.3 El genoma Bovino.	9
4.4 Métodos de análisis genético-molecular.	10
4.4.1 Herramientas moleculares para detectar variación en genomas.	
4.4.2 Análisis de secuencias repetidas.	
4.4.3 Herramientas moleculares para la búsqueda y confirmación de nuevas mutaciones.	
4. 5 El gen de MSTN	18
 5. MÉTODOS	 24
5.1 Material biológico	24
5.2 Origen de los reactivos	25
5.3 Aparatos	25
5.4 Extracción y cuantificación de ADN	26
5.4.1 Aislamiento de ADN	
5.4.2 Cuantificación de ADN	
5.4.2.1 Análisis UV	
5.4.2.2 Análisis de fluorescencia	
5.4.2.3 Densitometría	
5.5 Medición de temperaturas de disociación (T _m 's)	28
5.5.1 Reacción de PCR y protocolo de disociación	
5.5.2 Análisis estadístico y exactitud de la medición de T _m 's	
5.6 Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP)	31
5.6.1 Reacción de PCR	
5.6.2 Electroforesis	
5.7 Cromatografía de líquidos desnaturalizante (DHPLC)	35
5.7.1 Reacción de PCR	
5.7.2 Sistema cromatográfico	
5.8 Secuenciación	36
5.8.1 Purificación de bandas SSCP	
5.8.2 Purificación de productos de PCR	
5.8.3 Extracción y Revisión del ADN plasmídico	
5.8.4 Clonación	
5.8.4.1 Uso del estuche Topo XL	
5.8.4.2. Uso del estuche pGEM T Easy	
5.8.4.3 Caracterización de Recombinantes	
5.8.5 Reacción de secuenciación	
5.8.5.1 Preparación de la muestra	
5.8.5.2 Electroforesis	
5.8.6 Análisis y comparación de secuencias	

6. RESULTADOS.....	46
6.1 Cuantificación de ADN.....	46
6.2 Medición de Tm's.....	46
6.2.1 Amplificación de ADN	
6.2.2 Haplotipos de referencia	
6.2.3 Estadística de la medición	
6.3 Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP).....	51
6.3.1 Amplificación de fragmentos	
6.3.2 Detección de variantes	
6.4 Cromatografía de líquidos desnaturalizante (DHPLC).....	53
6.4.1 Estandar de referencia	
6.4.2 Haplotipos de referencia	
6.4.3 Análisis de Muestras	
6.5 Secuenciación.....	55
6.5.1 Tamizaje de clonas	
6.5.2 Extracción de ADN	
6.5.3 Análisis y Comparación de Secuencias	
7. DISCUSIÓN.....	61
7.1 Medición de Tm's	
7.2 Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP).	
7.3 Cromatografía de líquidos desnaturalizante (DHPLC).	
7.4 Secuenciación	
8. CONCLUSIONES.....	65
LITERATURA CITADA.....	67
APENDICES.....	75
A MÉTODO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	
B MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE ADN	
ANÁLISIS UV	
ANÁLISIS POR FLUORESCENCIA	
ANÁLISIS POR DENSITOMETRÍA	
C RESULTADOS DE CUANTIFICACIÓN DE ADN.	
D RESULTADOS DE MEDICIÓN DE TM'S.	
E AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS 1, 2 Y 3 DE ADN	
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	92

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Mutaciones posibles a nivel de ADN.....	11
2. Variantes nucleotídicas en el gen de MSTN.....	21
3. Mutaciones que producen el fenotipo doble musculatura.....	23
4. Razas de ganado bovino utilizadas en éste estudio.....	24
5. Tm's : iniciadores y tamaño del amplicón	28
6. Tm's: mezcla de reactivos para PCR.....	29
7. Tm's: Programa de temperaturas y protocolo de disociación	29
8. Variaciones nucleotídicas por haplotipo	31
9 SSCP: iniciadores.....	32
10 SSCP: mezcla de reactivos para PCR	32
11 SSCP: formulación del gel de poliacrilamida.....	33
12 Caracterización de recombinantes.....	42
13 Tm's de muestras control.....	47
14 Prueba estadística no paramétrica.....	50
15 Estadística de la medición Tm's y BESS.....	50
16 SSCP: perfiles electroforéticos.....	52
17 Variaciones nucleotídicas fragmento I y III.....	57
18 Variaciones nucleotídicas fragmento II.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Amplificación del fragmento de 112 pb en tiempo real.....	46
2. Tm's del alelo mutado y alelo normal	48
3. Dispersión de los valores de Tm's	49
4. SSCP: ganado chianina.....	51
5. SSCP ganado Limousin.....	52
6. DHPLC: estandar de referencia.....	53
7. DHPLC: ganado Beefmaster.....	54
8. DHPLC: ganado Chianina.....	55
9. Tamizaje de Clonas.....	56
10. ADN Plasmídico	56
11. Perfil SNP's del Gen <i>miostatina</i>	58
12. Perfil de Variación Nucleotídica en el Fragmento 1.....	59
13. Perfil de Variación Nucleotídica en el Fragmento 2.....	60
14. Perfil de Variación Nucleotídica en el Fragmento 3.....	61

SIMBOLOS Y NOMENCLATURA

Término	Definición
*700	Pentametín carbocianina
*800	Heptametín cianina
A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Alelo	Una de las formas alternativas de un gen en un locus particular en un cromosoma. En un individuo, una forma del alelo (dominante) puede ser expresado más que otra forma (recesivo). También pueden considerarse como un segmento de una secuencia de nucleótidos, por lo cual, alelo se refiere a las posibles alternativas de nucleótidos en una posición específica en la secuencia.
Amplicón	Fragmento de ADN
ARN	Ácido ribonucleico
BEES	Escaneo de secuencias por escisión de la base Timina .(Base Excision Sequence Scanning)
BTA2	<i>Bos taurus</i> , autosoma 2
Cm	Centimorgan
Delta Rn	Fluorescencia normalizada del reportero SYBR green con la señal de referencia pasiva (ROX).
dUTP	Uracil tri fosfato
EST	Marcadores de secuencia expresadas (Expressed sequence tags).
Genoma	Material genético contenido en los cromosomas de un organismo, generalmente se refiere al estado haploide del organismo.
Genotipo	Identidad genética de un individuo. Par de alelos para una región dada del genoma que un individuo presenta.
Haplotipo	
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
Medio LB	Medio Luria Bertani

MSTN	Simbolo aprobado para el gen de la <i>miostatina</i> . El símbolo previo GDF8 Factor 8 de crecimiento y diferenciación (Growth differentiation factor).
Mutación	Alteración estructural permanente en el ADN. En una población, las mutaciones son más raras que los polimorfismos.
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
nt	Nucleótido
°C	Grados Celsius, centígrados, unidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).
Polimorfismo	Variación genética presente en más del 1% de la población.
pPCR	Producto de PCR
PSA	Persulfato de amonio
Secuencia consenso	Nucleótidos o aminoácidos más comunes en cada posición en una secuencia de ADN, ARN, o proteínas homologas.
TBE 1X	Buffer tris-borato-edta (89 mM Tris borato, 2mM EDTA, pH 8.3).
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metilen-diamina
Templado	ADN utilizado como molde para la síntesis de material genético.
Tm's	Temperaturas de disociación, se define como la derivada de la variación máxima en Fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT).
μg	Microgramo
μL	Microlitro
UV	Ultravioleta

RESUMEN

En el ganado bovino en especial el de propósito de producción cárnica, el gen de MSTN ha sido muy estudiado por la importancia que presenta para la producción y calidad de la carne. Respecto a la secuencia del gen MSTN, se conocen variaciones tanto en la secuencia codificante como en las regiones no codificantes y no traducidas. Algunas de las mutaciones disruptivas del gen de MSTN asociadas al fenotipo conocido como doble musculatura, son características de algunas razas de ganado Europeo, otras mutaciones silenciosas o no disruptivas, se reportan en ganado *Bos indicus* y no en ganado *Bos taurus*. Debido al alto polimorfismo y efecto pleiotrópico del gen de MSTN, es necesario también contar con tecnologías de alto rendimiento que puedan aplicarse a nivel poblacional, por lo cual se decidió caracterizar 3 regiones que incluyeran las fronteras intrón-exón, mediante las metodologías SSCP, DHPLC, Medición de Tm's y secuenciación en ganado del Noreste de México; se incluyeron las razas Chianina, Simmental, Limousin, Brahman y Beefmaster. Se determinó que estas metodologías pueden adaptarse para detectar mutaciones conocidas, pero presentan deficiencias cuando se requiere monitorear todas las mutaciones (conocidas y desconocidas). Mediante secuenciación se confirmó que el ganado Limousin presenta en el exón 1, la mutación F94L; en ganado Chianina, no se detectó la mutación reportada en ganado Italiano Marchigiana E291X; la mutación en la región codificante del exón 1, nt267 A>G presente en ganado Limousin, también se encontró en ganado Brahman. En ganado Simmental se encontró una transición en la región codificante del exón 2, nt408 T>C y en la región no codificante del intrón 1, una inserción de T y una transición de purinas A>G.

ABSTRACT

In cattle, the MSTN gene has been extensively studied for the importance it has for production and meat quality. Regarding the MSTN gene sequence, some sequence variations are known in coding, noncoding and untranslated regions. Some of the disruptive mutations are gene associated with double-muscled phenotype characteristic of some European breeds of cattle, other nondisruptive or silent mutations, are reported in cattle *Bos indicus* but not in *Bos taurus* cattle. Due to the high polymorphism and pleiotropic effect of MSTN gene is also required to have high-performance technologies that can be applied at population level, so it was decided to characterize 3 regions that include the intron-exon boundaries, using the methodologies SSCP, DHPLC, Measurement of Tm's and sequencing in cattle of Northeastern of Mexico. The breeds studied were Chianina, Simmental, Limousin, Brahman, Beefmaster. It was determined that these methodologies can be adapted to detect known mutations, but are deficient when it is required to monitor all mutations (known and unknown). By sequencing was confirmed the mutation F94L in Limousin breed; the mutation E291X reported in Marchigiana (Italian cattle), was not detected in Chianina breed; the transition in the coding region of exon 1, nt267 A>G present in Limousin breed, was also found in Brahman breed. In Simmental breed was found one transition in the coding region of exon 2 nt408 T>C and two variations in noncoding region of intron 1: one insertion of T and one transition of purine A> G.

1 INTRODUCCIÓN

El genoma de especies agropecuarias presenta amplia variabilidad, la cual se hace evidente desde el número de cromosomas que poseen, por ejemplo, el número de pares de autosomas en cerdo es de 18, mientras que en ganado bovino se tienen 29 y un par de cromosomas sexuales en ambas especies. En estos cromosomas está empacado el ácido desoxirribonucleico (ADN). En mamíferos, la secuencia nucleotídica promedio es de 3 billones de pares de bases de largo y es donde se encuentran distribuidos los posiblemente 70 000 a 100 000 genes que codifican proteínas.

Un animal hereda de cada padre una copia de sus genes (excepto de cromosomas sexuales), cada copia puede diferir en puntos específicos de su secuencia. Muchas de estas diferencias no tienen efecto sobre el fenotipo del individuo, pero cuando las variaciones causan alteraciones en las proteínas o en el control de la expresión génica, esto da como resultado diferencias en el rendimiento entre animales, conociéndose como haploinsuficiencia cuando el rendimiento es menor (ejemplo: cantidad de leche, tasa de crecimiento, tamaño de camada, susceptibilidad a enfermedades). Tomando como base la genética cuantitativa, la mayoría de las características de interés productivo son cuantitativas y se emplean para evaluar el mérito genético en animales. La genética cuantitativa tiene como base el modelo poligénico que propone a las características

cuantitativas como resultado de la interacción de varios genes y el modelo estadístico se basa en el pedigrí y rendimiento de las características individuales y familiares.

Con el avance de la genética molecular, se ha incrementado el uso de marcadores moleculares base ADN para el mapeo genético y búsqueda de genes responsables parcial o en gran medida de la variabilidad presente en características multigénicas. Dos estrategias que han sido utilizadas para éste propósito son los estudios de ligamiento y gen candidato. Los estudios de ligamiento basados en mapas genéticos y búsqueda de loci de características cuantitativas (QTL) usan datos familiares y comparan estudios de segregación de marcadores genéticos (SNP's, microsatélites) y la característica a analizar. Los marcadores que tienden a co segregar con la característica en estudio, ofrecen una localización cromosómica aproximada del gen o genes involucrados en la variabilidad de la característica.

En base al conocimiento biológico y fisiológico de la característica, la segunda estrategia se enfoca a medir el polimorfismo genético sobre uno o varios genes (genes candidato) implicados en la variabilidad. Una mayor asociación entre el genotipo o haplotipo (serie de alelos a lo largo de una secuencia de ADN) y característica nos permite asegurar el mérito genético verdadero de un animal.

Un gen muy conservado en vertebrados e involucrado en el desarrollo de músculo esquelético es el gen miostatina (MSTN), se ha identificado como responsable de la hipertrofia muscular en diferentes especies y su caracterización molecular ha permitido establecer que presenta un alto número de polimorfismos. Cuando éstos cambios provocan que la proteína generada sea altamente inactiva, se produce el fenotipo de hipertrofia muscular conocido como doble musculatura. En razas de bovino, se ha

demostrado que el gen de la *miostatina* (MSTN) es un excelente marcador molecular que permite evaluar características de la carne y del crecimiento de los bovinos. La alta heterogeneidad alélica encontrada para éste gen, hace necesario su estudio en diferentes razas de ganado bovino, con el fin de establecer su potencial uso en programas de mejoramiento asistido por marcadores e identificar nuevas mutaciones que puedan explicar los fenotipos de los individuos.

En el presente estudio se realiza la caracterización molecular del gen de la MSTN en razas de ganado bovino de carne del noreste de México, con el fin de implementar metodologías de alto rendimiento para el análisis de variaciones nucleotídicas y comparar con los cambios nucleotídicos reportados en la literatura para éste gen.

2. HIPÓTESIS

Existe variación en la secuencia de nucleótidos del gen MSTN en las diferentes razas de ganado bovino de producción cárnica bajo estudio.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las variaciones nucleotídicas del gen de la *miostatina* en diferentes razas de ganado bovino de producción cárnica, localizado en la región noreste de México, mediante el uso de metodologías de alto rendimiento.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

3.2.1 Evaluar el método de medición de temperaturas de disociación (Tm's) para determinar variaciones nucleotídicas en el gen de la *miostatina*.

3.2.2 Evaluar la medición de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) para determinar las variaciones nucleotídicas en tres regiones polimórficas del gen de la *miostatina*.

3.2.3 Evaluar el método de cromatografía de líquidos desnaturizante (DHPLC) para determinar las variaciones nucleotídicas en el gen de la *miostatina*.

3.2.4 Determinar mediante secuenciación la posición y tipo de variaciones nucleotídicas en tres regiones polimórficas del gen de la *miostatina*.

3.2.5 Evaluar la variación genética y las herramientas moleculares utilizadas, con la información actual.

4 ANTECEDENTES

4.1 La Ganadería en México

La apertura comercial de México con países como Japón, Korea, China, representa una oportunidad de negocio para los productores nacionales de carne de bovino y desarrollar acuerdos y convenios para abastecer un nicho de mercado con características específicas de calidad. Sin embargo hay un mercado nacional insatisfecho que es actualmente cubierto con las importaciones principalmente de estados unidos (aproximadamente 200 000 ton./ año, en carne de canal), por lo cual es necesario que las principales cadenas productivas de bovino se integren para satisfacer a un mercado nacional e internacional cada vez más exigente en calidad y precio. También es importante contar con el desarrollo de nuevos productos a partir de carne de bovino, siendo de relevante importancia la participación activa de instituciones educativas, centros de investigación, industria privada y gobierno (Gallardo JL, 2006).

Los elevados costos para los ecosistemas ha sido el resultado de realizar la ganadería de una manera extensiva, produciendo un alto impacto negativo con la destrucción de zonas de selva baja y de matorrales, selvas altas perennifolias y para abrir paso a una ganadería de bajos rendimientos, lo que ha traído como consecuencia la pérdida de la autosuficiencia alimentaria de comunidades y regiones del país entero (Challenger, 1998)

La concentración anormal en la carne de hormonas, antibióticos y conservadores provoca severos daños a la salud, por lo cual es necesario tomar en cuenta la dimensión ambiental y salud del consumidor, implementando normas de producción para generar una actividad ganadera sustentable (Zorrilla RJ., 2007).

Los programas nacionales de gobierno como el PROGAN (producción pecuaria sustentable y ordenamiento ganadero y apícola) tienen como principal objetivo incrementar la productividad mediante prácticas tecnológicas sustentables de producción, asistencia técnica, capacitación y apoyo al financiamiento de ganado, logrando un incremento anual en la producción de ganado del 1 al 2% (http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/comite/BC/n_progan.pdf).

4.2 Las Razas de Bovinos de Carne

El concepto raza se puede definir como aquel grupo de animales con características comunes que se transmiten sin variación de una generación a otra. Las razas de ganado bovino se clasifican en dos grupos: grupo europeo o *Bos taurus* y grupo Indopaquistano o *Bos Indicus*. Dentro de las razas también se distinguen dos grupos, el cárnico y el lechero. Las razas más productivas son Europeas, resultado de la mayor aplicación de ciencia y técnica en su crianza, aunado a factores ambientales. Dentro del grupo *Bos Indicus* resaltan las razas Brahman y la Indobrasil. Estas razas han predominado en Latinoamérica, principalmente en las regiones del trópico y su productividad ha mejorado con el avance tecnológico (Gasque y Posadas, 2001). Mundialmente se reconocen alrededor de 1000 razas y variedades de bovinos (Snelling MW. 2007). En México, según

la región del país, predominan algunas razas de ganado para carne, por ejemplo, en las regiones áridas y semiáridas del norte y noreste, se encuentran las razas Herford, Angus, Charoláis y sus cruzas (Beefmaster, Bradford, Brangus), en las regiones templadas predomina las cruzas de ganado Europeo, en las regiones del trópico predominan las razas cebuinas y sus cruzas con razas europeas. En una clasificación de acuerdo al uso de los recursos genéticos, se reporta en México, 24 razas Europeas, 7 Cebuinas, 12 sintéticas y 2 como Otras, dando un total de 45 razas de bovino (SAGARPA, 2003).

4.3 El Genoma Bovino

Para obtener la secuencia del genoma bovino se utilizó el ADN de una vaca de la raza Herford, utilizando la técnica de escopetazo de genoma completo (WGS whole genome shotgun) con un cubrimiento del genoma de 6X, para la detección de SNP's se utilizó las razas Holstein, Angus, Jersey, Limousin, Brahman, y Rojo Noruego, con un cubrimiento del genoma de 1.5X (Womack, 2005). El genoma del ganado domesticado (*Bos taurus* y *Bos indicus*) ésta formado por 29 autosomas, 2 cromosomas sexuales y un mitocondrial, un tamaño estimado de 2.87 Gbp, un mínimo de 22,000 genes que codifican proteínas, un contenido de GC de 41.7%, similar al de otros mamíferos, un 27% de elementos repetitivos específicos como LINE, SINE, SSR como trinucleotidos AGC de 90 a 142 repeticiones, comunes en artiodáctilos, pero mayores en ganado, comparados con humanos y perros. La secuencia del genoma bovino, dentro de otros beneficios, permitirá entender la evolución de los mamíferos y acelerar las mejoras genéticas para tener mayor producción y calidad de carne y leche. El genoma bovino presenta un

número y organización de genes característico, que afecta los sistemas de reproducción, inmunidad, lactación y digestión, algunos de los cuales son: genes de lisozima tipo C expresados principalmente en el tracto intestinal, usados para degradar la pared celular de bacterias, los genes que codifican para defensinas y glicoproteínas asociadas al periodo de gestación, las familias de genes que codifican para las proteínas presentes en la leche, donde predomina la inmunoglobulina IgG a diferencia de la inmunoglobulina IgA presente en leche humana que durante la gestación atraviesa la placenta y ofrece inmunidad pasiva, el ganado obtienen esta inmunidad durante la ingestión de IgG presente en la leche. (The bovine genome sequencing and analysis consortium *et. al.*, 2009).

4.4 Métodos de Análisis Genético-Molecular

La replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es un proceso biológico eficiente gracias a la capacidad de las ADN polimerasas y a los sistemas de corrección celulares para mantener la integridad de la molécula del ADN. Sin embargo, el ADN es susceptible a cambios que pueden modificar la secuencia de los nucleótidos de cualquier región del ADN y causar la variación genética entre especies y organismos. Estos cambios pueden ser principalmente substituciones, deleciones e inserciones y producir variantes genéticas que provocan las modificaciones estructurales en proteínas, lo que predispone en el caso del humano a cerca de 1000 enfermedades y a diferentes fenotipos ó características morfológicas en plantas y animales. La variación genética se produce continuamente a causa de las mutaciones cromosómicas y génicas, las cuales se propagan en los

organismos de reproducción sexual mediante el proceso de recombinación. En la Tabla 1, se observa una clasificación de mutaciones en base al número de pb involucrado.

Tabla 1

Mutaciones posibles a nivel de ADN en pares de bases (pb).

Escala	Mutación
< 0.1 pb	Metilación
1 pb	Transiciones, transversiones
1-10 pb	Deleciones, inserciones
10-10 ² pb	Deleciones, inserciones, inversiones, duplicaciones
10 ² -10 ³ pb	Exon (es), intron(es), completos
10 ³ -10 ⁵ pb	Genes completos
10 ⁵ -10 ⁷ pb	Conjunto de genes
10 ⁷ -10 ⁹ pb	Segmentos de cromosomas o cromosomas completos

La información genética de los organismos eucariontes se encuentra en el ADN empacado eficientemente en los cromosomas y los cambios cromosómicos (mayores de 1Mbp) pueden ser detectados mediante técnicas citogenéticas que actualmente emplean fluorescencia, como la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH). Variaciones mas sutiles a nivel de secuencia de nucleótidos, pueden analizarse mediante técnicas que han mejorado con los avances de la tecnología y que permiten detectar y medir la variación, como en el caso de los polimorfismos de nucleótidos de una sola base (SNP's). Aunque no hay una técnica ideal, pues su aplicación y uso dependen de factores como la disponibilidad de equipo, costo de implementación, aplicación a gran escala, sensibilidad, resolución, reproducibilidad y principalmente del problema biológico a resolver. (Frayling, 2002)

Cuando se desea medir las variaciones en la secuencia del ADN a lo largo del genoma, puede utilizarse el método AFLP's (amplified fragment length polymorphisms), RAPD's (randomly amplified polymorphic DNA), RFLP's (restriction fragment length polymorphisms), análisis de microsatélites y análisis de minisatélites. Técnicas aplicadas a un gen específico para detectar mutaciones conocidas como en el caso de diagnóstico de enfermedades ó la búsqueda de nuevas mutaciones, utilizan la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) apoyándose con detección fluorescente, hibridación, electroforesis, cromatografía.

4.4.1 Herramientas Moleculares para Detectar Variación en Genomas.(Taylor, 1997; Yan and Zhou,2004; Anollés and Gresshoff,1997)

AFLP's: Marcadores genéticos dominantes, pueden ser monitoreados de manera co-dominante, utilizan la reacción de PCR para tamizar de manera rápida y eficiente la diversidad genética. Debido a su alta reproducibilidad y facilidad de uso, tienen una alta aplicación en sistemática, pato-tipificación, genética de poblaciones, mapeo de genes (loci) con características cuantitativas (QTL's), huella ó perfil específico de ADN.

RAPD's: Marcadores genéticos dominantes, homocigotos, reproducibilidad sujeta a procedimientos estrictos. No requiere información previa del genoma, utiliza iniciadores universales y pequeña cantidad de ADN. Se aplica en el desarrollo de mapas genéticos, mapeo de características específicas en poblaciones, huella de ADN, análisis de germoplasma, distancias genéticas entre individuos y estimaciones relativas de contribuciones parentales entre individuos. Se reporta el uso de ésta técnica para

caracterizar 5 razas de bovinos, nativas de Brasil y dos razas comerciales (Serrano *et al.*,2004)

RFLP's. Esta técnica es muy utilizada cuando se requiere analizar un número moderado de muestras con baja cantidad de resolución, también para mapeo de genes en mamíferos y plantas. Son marcadores genéticos co-dominantes y puede o no requerir información de la secuencia de ADN, pueden utilizarse para detectar mutaciones conocidas.

Ecotilling: Método similar al TILLING (targeting induced local lesions in genomes). De alto rendimiento para detectar SNP's. No utiliza mutágenos químicos para inducir mutaciones, utiliza el principio de formación de heteroduplex y corte enzimático en la posición del cambio nucleótido, con monitoreo fluorescente, utilizada para el descubrimiento de SNP's en humanos y plantas.

4.4.2 Análisis de Secuencias Repetidas, Localizadas a lo largo del Genoma. .(Taylor GR, 1997; Yan and Zhou,2004; Anollés and Gresshoff,1997; DeFrancesco and Perkel 2001, Buzin *et al*, 2000, Pogue *et al*, 1998, Haegeman *et al*, 2003, Zhou *et al.*,2005; Laughlin *et al.*,2003).

Minisatélites (MVR). Los minisatélites son loci de ADN polimórfico que se encuentran a lo largo de todo el genoma. Son secuencias de 9 a 100 pb repetidas hasta 1000 veces. Se han usado para pruebas de identificación individual, pedigrí, análisis de ligamiento, mejoramiento de plantas, estudios poblacionales, huella de ADN, además de marcadores genéticos en enfermedades como brucelosis, incluyendo cáncer y mutación en células germinales. El análisis puede realizarse mediante digestión sencilla del ADN

con enzimas de restricción, registrando el patrón de bandas características mediante electroforesis en gel.

Microsatélites. Son repeticiones de secuencia simple (SSR) o repeticiones de secuencia corta (STR), de 1 a 6 pb, presentan alto nivel de heterocigotos, herramientas útiles para diagnóstico de enfermedades, pruebas de identidad y forense, estructura poblacional, son altamente polimórficos y fáciles de analizar. Pudiera decirse que el uso de microsatélites ha revolucionado el análisis genético. Las pruebas actuales de paternidad e identidad de humanos se basan en el análisis de microsatélites

4.4.3 Herramientas para la Búsqueda y Confirmación de nuevas Mutaciones

Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP). Método utilizado para separar las cadenas de polinucleótidos (nativas y mutadas), en geles no desnaturalizantes, se analiza la movilidad electroforética que depende de la secuencia del fragmento y la posición de la mutación. El fragmento de ADN se amplifica por PCR y debe ser menor de 400 pb, para una buena detección de los cambios en la secuencia. Las condiciones de análisis se optimizan de acuerdo al fragmento de ADN y se reportan modificaciones para automatizarlo mediante electroforesis capilar. Mediante un método que optimiza las condiciones del desarrollo de electroforesis, detecta al menos 96.5% de las mutaciones (DOVAM-SSCP). Aplicando SSCP-RFLP y secuenciación, se encuentra 13 SNP en 4 genes diferentes. Se reporta el uso de PCR-SSCP para detectar alelos en el gen de ovino *PRNP* (prion protein gene) causante de la enfermedad de Scrapie en ovinos.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). Las moléculas de ADN hasta con un nucleótido diferente, pueden separarse mediante electroforesis en geles con gradiente de concentración de un agente desnaturalizante como la urea ó formamida. La técnica fue originalmente diseñada para detectar mutaciones puntuales en muestras clínicas, se utiliza para medir la diversidad molecular de poblaciones microbianas y otros organismos, a diferencia de la técnica de SSCP, DGGE puede distinguir variaciones en fragmentos de ADN de 1 a 2 kb.

Análisis Heteroduplex (HDA). Puede utilizarse en conjunto con el análisis de SSCP para lograr detectar variaciones que no se distinguen mediante SSCP. Útil para diferenciar la movilidad electroforética inducida por un anillo (loop) y para la detección de mutaciones en ADN mitocondrial.

Rompimiento químico o enzimático. Esta metodología se utiliza cuando se desea romper en el punto de cambio del nucleótido y posteriormente analizar el tamaño y secuencia de los fragmentos, se usan nucleasas y compuestos químicos como el tetroxido de osmio, permanganato de potasio e hidroxilamina. Análisis utilizado para descubrimiento de nuevas mutaciones o diagnóstico de mutaciones conocidas.

Detección de mutaciones puntuales: ARMS (Amplification refractory mutation system). Por su especificidad a sido aplicada en diagnóstico de cáncer, se basa en el uso de iniciadores con el oligonucleótido involucrado en el cambio, lo que permite que se lleve a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el ensayo consiste en realizar 2 pruebas complementarias de PCR y la presencia o ausencia del producto de PCR indica el genotipo de la muestra.

Cromatografía en condiciones desnaturalizantes (DHPLC). Es un método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento, aplicado a la detección de variaciones en fragmentos menores de 1000 pb, los avances en ésta tecnología permiten la automatización y procesamiento de mayor cantidad de muestras en menor tiempo que los métodos en gel DGGE y SSCP. Algunas aplicaciones de la técnica de DHPLC incluyen la discriminación alélica, mapeo de genes, análisis de microsatélites, cuantificación de expresión génica, aislamiento de clonas para secuenciación, análisis mutacional de genes candidato (Frueh *et al*, 2003; Xiao *et al*, 2001, Pan *et al*.,2003, Randal *et al*.,2005). Éste tipo de cromatografía requiere del uso de columnas especiales que separen heteroduplex y realicen la separación por tamaño de los fragmentos de polinucleótidos. Un requisito importante para la identificación de mutaciones es la optimización del gradiente de temperatura y solventes, aunque algunas aplicaciones manejan condiciones isocráticas e isotérmicas. Al igual que otros métodos se requiere de secuenciación para la confirmación ó identificación de mutaciones. Se reporta el uso de DHPLC y secuenciación para estructurar 8 razas de cabras Italianas en 264 animales en un total de 35 genes (Pariset *et al*.,2006).

Ligación de oligonucleótidos (OLA): Técnica Utilizada para obtener una mayor especificidad en la detección de mutaciones que la obtenida en ensayos normales de una sonda, su especificidad radica en el uso de 2 sondas que alinean muy cerca una de otra en el ADN para después ligarse, éste método puede utilizar varios pares de sondas y hacerse múltiplex para detectar diferentes alelos. Varias mutaciones puntuales han sido detectadas de manera múltiplex como en la enfermedad de fibrosis quística, en el gen

rpoB de *Mycobacterium tuberculosis*, en individuos positivos al subtipo HIV-1, en la genotipificación del gen *miostatina*.

Medición de temperaturas de disociación (T_m 's). La diferencia en la temperatura de disociación entre una secuencia normal y una mutada, se emplea para medir variaciones nucleotídicas. Utilizando la química de la fluorescencia, se pueden emplear moléculas fluorescentes que se incorporen a la doble cadena de ADN durante la formación del producto de PCR y posteriormente aplicar un gradiente de temperatura para localizar el punto de disociación de la doble cadena. Este es un método que depende de la especificidad de la PCR. Para la detección de mutaciones conocidas, la medición de T_m 's puede ser más específica y automatizarse para disminuir los tiempos de ensayo, esto se logra utilizando iniciadores que incluyan un ancla de GC y la mutación en cuestión. (Kojo *et al.*, 2001; Bohling *et al.*, 1999, Wittwer *et al.*, 2003; Gundry *et al.*, 2003, Liew *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2005) Se reporta el uso de curvas de disociación para establecer diferencias en comunidades microbianas y realizar un primer tamizaje poblacional (Rudi *et al.*, 2005)

BESS (Base Excision Sequence Scannig). Es una técnica para detectar SNP de fácil manejo y automatización para disminuir el tiempo de análisis, utiliza una mezcla de dNTP modificados (dGTP y dUTP), para realizar la PCR que posterior a una digestión enzimática (ENDO IV, UNG) los fragmentos terminan con G o T en sus extremos los cuales se detectan mediante electroforesis en gel o capilar. (Barber *et al.*, 2000)

Secuenciación. Los procedimientos de secuenciación de ADN, más utilizados se basan en el método enzimático descrito por Sanger en 1977. Como aplicaciones derivadas de la secuenciación podemos mencionar la secuenciación comparativa, los diferentes tipos de

genotipificación como AFLP's, estudios de paternidad, búsqueda y validación de mutaciones, descubrimiento y validación de SNP, identificación de microorganismos basada en secuencias específicas y otros polimorfismos. Es una metodología utilizada para confirmar y buscar nuevas mutaciones, método molecular de alta resolución, caro por la inversión inicial en equipo, pero muy recomendado por la exactitud de sus resultados. Una técnica de secuenciación para determinar variaciones nucleótidas es el SNPshot, mediante el cual se detectan a lo largo de la secuencia del ADN los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Applied Biosystems, 2002). Nuevas tecnologías de secuenciación masiva como pirosecuenciación, o secuenciación por síntesis y resecuenciación mediante microarreglos están emergiendo para disminuir los costos y tiempo de secuenciación. Debido a los avances de éstas tecnologías, actualmente se acepta por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) un nuevo formato de secuenciación (SFF), adicional al formato aceptado para el método de Sanger.

4.5 El Gen de MSTN

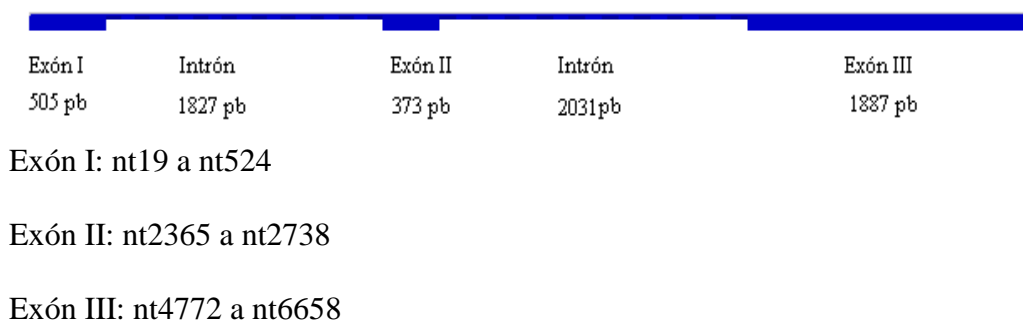
La MSTN o factor de crecimiento y diferenciación (GDF-8) es un miembro de la superfamilia del factor β de crecimiento y transformación (TGF- β) y actúa como regulador negativo del desarrollo celular muscular, gen conservado en el grupo de vertebrados (Jin and McPherron, 2004). El gen MSTN se expresa principalmente en músculo esquelético, con un N-terminal como señal secretoria, un dominio propeptido y un dominio C-terminal, su expresión también se ha reportado en otros tejidos, incluyendo glándulas mamarias (Ji et al., 1998). El propeptido es proteolíticamente procesado por

BMP-1 (proteína de hueso morfogenética-1) para producir una proteína madura de 13 kDa (Wolfman, 2003; Ducy and Karsenty 2000). La miostatina es un homodímero activo que puede formar un complejo inactivo con el propeptido. Las proteínas que interactúan con la miostatina y pueden regular la secreción son: el pequeño tetra-tricopeptido rico en glutamina (SGT) (Wang, 2003), follistatina, gen relativo a follistatina (FLRG), gen 1 específico de arresto al crecimiento (GAS-1), teletonina (Lee 2004; Hill *et al.*, 2006; Lee and McPherron 2001; Nicholas 2002). De manera similar a los miembros de la superfamilia TGF- β , la miostatina interactúa con el receptor B de activina tipo II, con receptores tipo I como activina similar receptor quinasa 4 (ALK4) o ALK5 para posteriormente inducir la fosforilación de Smad2 y Smad3 que interactúan con proteínas que enlazan al DNA y finalmente desregulando la miogénesis (Arnold *et al.*, 2001). Cuando la miostatina interactúa con BMP-7 desregula la adipogénesis (Rebbapragada, 2003). Las diferentes mutaciones en el gen de la MSTN producen efectos de hiperplasia (incremento en el número de fibras musculares) e hipertrófia (incremento en el tamaño de fibras musculares), llegando a expresarse el fenotipo conocido como doble musculatura, característico de algunas razas de ganado Europeo Belgian Blue y Piedmontese entre otras (McPherron and Lee, 1997; Grobet *et al.*, 1997; Karim *et al.*, 2000; Kambadur *et al.*, 1997; Fahrenkrug *et al.*, 1999; Bellinge *et al.*, 2005; Potts *et al.*, 2003), o producir efectos deseables en la composición y suavidad de la carne (Casas *et al.*, 2003, 2004).

Con la secuenciación y análisis del gen de la MSTN en varias especies rumiantes, la MSTN parece ser crucial pero no el único gen involucrado en la regulación muscular. La presión positiva y selectiva en el ganado realizada durante la domesticación ha dirigido

efectos fenotípicos importantes como la producción de leche y carne (Smith *et al.*, 2003, Tellgren *et al.*, 2004), involucrando la selección asistida con marcadores MAS (Sonstegard and Tassell, 2004).

El gen de la MSTN se localiza en el genoma bovino en el cromosoma 2, locus 2q14-q15, gen ID 281187. El gen de la MSTN contiene 6691pb distribuidos en 3 exones y dos intrones. (Jeanplong *et al.*, 2001)



La heterogeneidad alélica del gen MSTN fue determinada en razas de ganado Europeo que presentan doble musculatura. En la tabla 2 se observa los polimorfismos encontrados.

TABLA 2

Variantes nucleotídicas en 10 razas de ganado Europeo, 7 variantes nucleotídicas encontradas en la región codificante y 4 en la región no codificante. (Grobet *et al.*,1998)

Nombre	Región del gen MSTN	Cambio nucleotídico
F94L	Exón I	C>A
nt419 (del 7-ins10)	Exón II	TTAAATT>AAGCATACAA
Q204X	Exón II	C>T
E226X	Exón II	G>T
nt414	Exón II	C>T
nt821 (del 11)	Exón III	ATGAACACTCC>*
C313Y	Exón III	G>A
Nt374-51	Intrón I	T>C
Nt374-50	Intrón I	G>A
Nt374-16 (del 1)	Intrón I	T>*
Nt748 (del 1)	Intron II	T>*

En ganado de la raza Marchigiana se reporta una transversión de G >T en el tercer exón del gen MSTN que produce un codón de terminación prematuro en la posición 874 llamada E291X.(Marchitelli *et al.*,2003).

Se reporta la determinación de la mutación Q204X en ganado Charolais utilizando la técnica de PCR-RFLP (Dvorak *et al.*,2002).

En un estudio con ganado europeo, se utilizaron 678 animales y 28 razas de bovinos, reportando 10 mutaciones del tipo silencioso, 3 mutaciones sin sentido no disruptivas (S105C, F94L, D182N) y 6 mutaciones disruptivas (Q204X, nt419 del7-ins10, E226X, C313Y, nt821 del 11, E291X). Algunas mutaciones se presentaron casi exclusivamente en una raza de ganado como por ejemplo la Q204X en ganado de la raza Charolais, la mutación F94L en la raza Limousin. (Miranda *et al.*,2002, Dunner *et.al.*, 2003).

Se reporta el uso del método OLA para determinar en 10 razas de ganado bovino, 6 mutaciones que causan pérdida de la función de la miostatina. En la tabla 3 se listan las mutaciones. (Karim *et al.*, 2000).

TABLA 3

Mutaciones que producen el fenotipo bovino de doble musculatura

Tipo de mutación génica (posición del nucleótido después del codón de iniciación)	Cambio en el polipéptido	Raza de ganado bovino
Deleción de 11 pb (821)	Rompimiento del polipeptido, debido a un codón de paro prematureo	Belgian Blue, Blonde d'Aquitaine, Limousin, Parthenaise, Asturian, Rubea Gallega, South Devon
Transición G>A (938)	Substitución de tirosina por cisteína	Gasconne, Piedmontese
Deleción de 7 pb e inserción de 10 pb (419)	Rompimiento del poli péptido, debido a un codón de paro prematureo	Maine Anjou
Transición C>T (610)	Rompimiento del poli péptido, debido a un codón de paro prematureo	Charolais, Limousine
Tranversión G>T (676)	Rompimiento del poli péptido, debido a un codón de paro prematureo	Maine Anjou
Tranversión G>T (874)	Rompimiento del poli péptido, debido a un codón de paro prematureo	Marchigiana

Se reporta en una población de ganado comercial Aberdeen Angus, la mutación 821 (del 11pb), con una frecuencia del 7.2% para el genotipo *silvestre/del 11*, la cual se asoció con un mayor rendimiento de carne; el genotipo homocigoto no se encontró (Gill, 2008). Se reporta una prueba para detectar la mutación 938 (transversión G>A) mediante

PCR alelo específica para determinar el alelo(s) mas comunes responsables del fenotipo doble musculatura en ganado Piedmontese y Belgian Blue (Fahrenkrug *et al.*, 1999).

En un estudio con cruza de ganado Limousin y Jersey, se encontró que la presencia del alelo g433A incrementa un 2.3% del total de carne, relativo al alelo g433C. Ambos alelos representan la mutación F94L, característica del ganado Limousin. (Sellick *et al.*, 2007).

Se utilizó la técnica de AFLP para generar marcadores genéticos que pudieran distinguir la raza resultante de la crusa entre ganado Negro Japonés y Holstein (Sasazaki *et al.*, 2004, 2007).

En la secuencia del gen miostatina del ganado *Bos indicus*, se reporta 5 SNP en la región exónica, 4 son mutaciones sinónimas y una no sinónima, se substituye el aminoácido serina por asparagina, (S214N). Además se reportan inserciones de 16 y 12 pb en el intron I (Tantia *et al.*, 2006).

Se reporta las secuencias nucleotídicas y los métodos para detectar las variantes alélicas del gen de *miostatina* en individuos que presentan un incremento significativo de masa muscular, comparados con el tipo silvestre (Lee and Mc Pherron ,2004).

Se ha propuesto una técnica de PCR-tiempo real, como una herramienta de genotipificación para certificar la calidad de la carne de bovino, mediante el monitoreo de 3 mutaciones en el gen de la *miostatina* (Pozzi *et al.*, 2004).

5. MÉTODOS

5.1 Material Biológico

Se utilizó la sangre obtenida por punción cervical del ganado bovino proveniente de ranchos localizados en los estados de Tamaulipas y Nuevo León, de la cual se realizó la extracción de ADN. La raza de ganado bovino analizada, se indica en la Tabla no. 4. La sangre fue colectada en tubos vacutainer con el anticoagulante sal disodica del ácido amino tetracético (AEDT.2Na) y mantenida en hielo durante su transporte al laboratorio. Para el caso del ganado Beefmaster, se utilizó el ADN de 104 muestras depositadas en el banco de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN).

Tabla 4
No. de animales y razas de ganado bovino

Localidad	Raza de bovino	No. de Individuos
Nuevo León	Chianina	16
Tamaulipas	Simmental	55
Tamaulipas	Brahman	50
Nuevo León	Limousin	25
Tamaulipas	Beefmaster	104

En el análisis de temperaturas de disociación (T_m 's) se evaluaron 104 individuos de ganado bovino, de la raza Beefmaster, se incluyó hembras, sementales y becerros, 11 muestras del ganado de raza Chianina y 5 muestras de ganado de la raza Simmental.

Para la detección de SSCP se utilizaron 72 muestras del ganado de carne de las razas Chianina, Simmental, Brahman, Limousin y Beefmaster.

Para la detección de variaciones nucleotídicas mediante DHPLC en ganado bovino se seleccionaron 14 animales de la raza de ganado Chianina y 5 animales de la raza Beefmaster de genotipo conocido.

El análisis de secuenciación se realizó en muestras que presentaron patrones electroforéticos de SSCP representativos de la raza de ganado y con posibles cambios en la secuencia nucleotídica

.

5.2 Origen de los Reactivos

Los reactivos utilizados fueron grado biología molecular, obtenidos de las casas comerciales Li-Cor (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA), Sigma (Sigma –Aldrich, St. Louis Missouri, USA), Promega (Madison, WI, USA), Invitrogen (Carlsbad, California USA).

5.3 Aparatos

Termociclador PTC 200 (MJ Research, Walthman, Mass. USA).

Termociclador tiempo real ABI 7000 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), con el programa de gradiente de temperatura de 60°C a 90°C.

Secuenciador LiCor 4200 02G (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA)

Centrifuga de alta velocidad Avanti J20 (Beckman, Coulter Inc. Fullerton California, USA)

Fluorometro TD-360 (Turner Designs, Sunnyvale, California, USA)

Microcentrifuga Hermle Z 200 A (Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemania)

Mezclador térmico para microtubos Eppendorf Thermomixer (Brinkman Instruments, Inc. Westbury, New York, USA)

Sistema Fotodocumentador EDAS 120 (Eastman Kodak Company, Rochester N.Y. USA)

5.4 Extracción y cuantificación de ADN

5.4.1 Aislamiento de ADN

Para el aislamiento del ADN se utilizó 3 mL de sangre y aplicó 2 lavados con 9 mL de solución de lisis I (155ml NH₄Cl, 0.1mM EDTA, 10ml NaHCO₃, pH 7.4) antes de continuar con las instrucciones indicadas en el estuche comercial Wizard (Promega, Madison, WI, USA), descritas en el apéndice A. El precipitado de ADN se recuperó en un tubo de 1.5 ml y fue secado y disuelto en 250 uL de agua milli-Q (Millipore Corporation, Bedford , MA, USA) esteril.

5.4.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN, se realizó mediante 3 métodos en la raza de ganado Chianina: análisis UV a 260 nm y 280 nm, análisis por fluorescencia con el reactivo Hoechst 33258 y análisis por densitometría en el fotodocumentador EDAS 120 (Eastman Kodak Company Rochester, N.Y. USA); en las otras razas de ganado se utilizó solamente la cuantificación mediante análisis UV.

5.4.2.1 Cuantificación de ADN mediante Análisis UV

La cuantificación se realizó mezclando 5µl de ADN en 495 uL de agua. La concentración y calidad de ADN se obtuvo en el espectrofotómetro DU 650 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton California, USA) con lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm. La concentración de ADN se determinó de la siguiente manera:

Concentración (ng/µl)=(Abs 260nm)(Factor de dilución)(Factor de conversión)

Donde:

Abs 260nm= Absorbancia a 260nm

Factor de dilución= (Volumen total de dilución)/ (Volumen de la muestra): 500uL/5uL
=100

Factor de conversión= 50 µg/ml para un ADN de doble cadena

La calidad de las muestras extraídas se obtuvo con la siguiente fórmula:

Calidad= Absorbancia 260nm/Absorbancia 280nm

-El rango de calidad aceptable se encuentra entre 1.8-2.0

5.4.2.2 Cuantificación de ADN mediante Fluorescencia usando reactivo Hoechst

33258

Ver Apéndice B2

5.4.2.3. Cuantificación de ADN mediante Densitometría

Ver Apéndice B3

5.5 Medición de Temperaturas de Disociación (Tm's)

5.5.1 Reacción de PCR y Protocolo de Disociación

Las variaciones nucleotídicas se buscaron en un fragmento de 112 pb y en un fragmento de 681 pb del gen de la *miostatina* (Genbank: AF320998). que incluyen el exón II y su región flanqueante del Intrón I. En la Tabla 5 se encuentra la información respecto al amplicón y las secuencias de los iniciadores.

Tabla 5

Secuencia de iniciadores utilizados en la medición de Tm's, para amplificar los fragmentos de ADN

Secuencia de iniciadores	Amplicón	
	*Posición	Tamaño
2F 5' -GATTGATATGGAGGTGTTTCG- 3' 2R 5' -CAACATTTGGGTTTTCTTC- 3'	nt2293 a nt2404	112 pb
M5F 5' -ATAGAATTTTCCTTAGTCCAC- 3' M5R 5' -GGTTTTTAGCATGTTATTTTCAGTA- 3'	nt2092 a nt2773	681 pb

*Genbank: AF320998

Para llevar a cabo la reacción de PCR, se utilizó la mezcla de reactivos indicada en la siguiente tabla.

Tabla 6

Mezcla de reactivos para llevar a cabo la reacción de PCR

Reactivo	Volumen (μL)
Master mix SYBRgreen (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)	12.5
Iniciador sentido 2F (5μM)	1
Iniciador anti-sentido 2R (5μM)	1
Templado (100ng/μL)	3

La mezcla se realizó en una microplaca de 96 pozos (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) y centrifugó a 2500 rpm/10min antes de cargarse al Termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) con el programa de temperaturas indicado en la tabla 7, se realizó la reacción de PCR y la disociación térmica del colorante SYBR Green I enlazado en la doble cadena de ADN. La gráfica y temperatura de disociación (T_m 's) correspondiente a cada muestra, se generó utilizando el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Tabla 7

Programa de temperaturas para realizar la reacción de PCR y el protocolo de disociación

Estado	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Repetición
1	50	2	1
2	95	10	1
	95	1	
3	55	1	30
	72	1	
4	72	5	1
5	6	10	1
¹ 6	60°C a 95°C	20	1

¹ Protocolo de disociación

Los resultados se exportaron al programa computacional Microsoft office Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) donde se evaluaron las diferencias en temperatura de disociación (Tm's).

5.5.2 Análisis Estadístico y Exactitud de la Medición de Tm's

La reproducibilidad de la medición de Tm's, se determinó mediante el análisis de cada haplotipo (AA, BB, CC, AB, AC) en replicas de 4, considerando el haplotipo AA como normal. A continuación se presenta la fracción de la secuencia del gen de la miostatina (GenBank AF320998) de 112 nucleotidos, que incluye los 5 haplotipos y sus variaciones nucleotídicas:

GATTGATATGGAGGTGTTTCGTT(*C/T*)(*A/G*)TTTTTCATAAAAATGATCTT
 AGTAACTTTTT(*T/**)CTTATTCATTATAGCTGATCTTCTAACGCAAGT
 GGAAGGAAAACCCAAATGTTG

En la Tabla 8 se anota la variación nucleotídica para cada haplotipo.

Tabla 8

Variaciones en la secuencia de nucleótidos correspondientes
a una delección de T y dos transiciones (A>G) y (C>T)
para cada haplotipo

Mutación	Haplotipo
nt 374-16 (del T)	BB, CC, AB, AC
nt 374-50 (A>G)	CC, AC
nt 374-51 (C>T)	CC, AC

Se determinó estadísticamente la capacidad del ensayo de disociación para distinguir individuos portadores de cambios en la secuencia del fragmento de *miostatina*, mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Guzmán y Tirado, 1993). La exactitud de la medición de Tm's se verificó comparando los resultados obtenidos con la técnica BESS-T (Base Excision Sequence Scanning) en ganado Beefmaster (De la Rosa, 2003)

5.6 Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP)

5.6.1 Reacción de PCR

De acuerdo a la literatura (Dunner *et.al.*, 2003) fueron seleccionadas 3 fragmentos polimórficos del gen de la *miostatina*. Los iniciadores y tamaño del amplicón generado para cada fragmento, se encuentran indicados en la tabla 9.

Tabla 9

Iniciadores y características del amplicón generado en las regiones del gen MSTN para el análisis mediante SSCP

Fragmento	*Posición	Tamaño	Iniciador sentido Iniciador anti-sentido
1	nt226 a nt644	419 pb	1F 5´-GAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGG- 3´ 1R 5´-CCCTCCTCCTTACATACAAGCCAGCAG- 3´
2	nt2293 a nt2404	112 pb	2F 5´-GATTGATATGGAGGTGTTTCG- 3´ 2R 5´-CAACATTTGGGTTTTCCTTC- 3´
3	nt4665 a nt5042	378 pb	3F 5´-GAAATGTGACATAAGCAAAATGATTAG- 3´ 3R 5´-AGCAGGGGCCGGCTGAACCTCTGGG- 3´

*Referencia: Genbank: AF320998

La PCR se realizó en un termociclador PTC200 (MJ Research, Walthman, Mass. USA), bajo el siguiente programa de temperaturas: un paso de activación enzimática a 95°C por 10 min., seguido por 30 ciclos de [94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min], y un paso final de 72°C por 5 min. La mezcla de reactivos para realizar la PCR fue la siguiente:

Tabla 10

Componentes para la reacción en cadena de la polimerasa

Componente	^a Concentración
Buffer M188J(Promega, Madison, WI, USA)	1.5mM
Cloruro Magnesio (Promega, Madison, WI, USA)	0.5mM
Desoxi-tri-fosfato (dNTP's): (Promega, Madison, WI, USA)	200uM
Iniciador sentido (Tabla 2)	5pmol
Iniciador anti-sentido (Tabla 2)	5pmol
ADN Taq polimerasa (Promega, Madison, WI, USA)	5u
ADN templado (100ng/ul)	300ng
Agua milli-Q esteril	37uL
Volumen total	50uL

^a= concentración final

La amplificación de los fragmentos de ADN se revisó en gel de agarosa al 2.0 %(p/v), se cargó cada pozo del gel con 5 uL del pPCR mezclados con 2 uL de SYBR-Gold 100X

(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR. USA) y 1 uL de colorante de carga Promega G190 (0.15% ficoll 400, 0.03 % xilen cianol, 0.03 % azul de bromofenol, 0.4% naranja G, 10mM Tris-HCL pH 7.5, 50mM EDTA).

5.6.2 Electroforesis SSCP

Se realizó en una cámara Wide (Bio-Rad Laboratorios, Inc. Hercules Ca. USA), en amortiguador TBE 1X, aplicando un voltaje de 10 V/cm, durante 1 h. Para visualizar las bandas se utilizó el fotodocumentador EDAS 120, (Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y. USA) con el software 1D Image Analysis del mismo proveedor.

Se mezcló 40 uL del producto de PCR con 20 uL de la mezcla desnaturizante (10mM EDTA.2Na, 0.1 % xilen cianol, 0.1 % azul bromofenol, 95% formamida, pH 11) y se sometió a desnaturización a 95°C/10 min, al termino del ciclo se transfirió de inmediato a hielo y mantuvo así hasta cargar en el gel nativo de poliacrilamida, formulado de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 11

Formulación del gel de poliacrilamida para análisis de SSCP

Componente	^bCi	^cCf	Volumen
^a Poliacrilamida	2 X	0.8 X	14 mL
TBE	10 X	0.5 X	1.75 mL
TEMED	100 %		25 uL
PSA	10 %		250 uL
Agua			18.98 mL

Volumen final	35 mL
---------------	-------

^aPoliacrilamida A5938 (Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. Toluca México), ^bCi= concentración inicial, ^cCf= concentración final, TEMED= NNNN tetrametilendiamina, TBE= amortiguador TRIS-BORATO-EDTA, PSA= persulfato de amonio.

La electroforesis en gel nativo de poliacrilamida se llevo a cabo en una cámara P10DS

(OWL, Portsmouth, NH., USA) bajo el siguiente protocolo:

1 Tratar el vidrio anterior de la cámara de electroforesis con: 1 ml de alcohol etílico al 95%, dejar secar por 2 minutos, aplicar la mezcla de silano (1 ml etanol 95% + 5ul ácido acético glacial + 1 ul silano (Promega Q421A, 170350), incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, eliminar el exceso de silano con 1 ml de etanol al 95%.

2 Preparar 35 mL del gel de poliacrilamida 0.8X de acuerdo a la Tabla 11, vaciar a los vidrios previamente armados con espaciadores de 0.8mm y peine para 15 muestras.

3 Dejar polimerizar una hora y 30 minutos.

4 Quitar el peine y lavar los pozos con agua desionizada ayudándose con una jeringa, marcar con plumón el centro de cada pozo.

5 Armar la cámara de electroforesis y adicionar amortiguador TBE 0.5 X pH 8.3, previamente enfriado a 8 °C.

6 Cargar los pozos del gel con 60 uL del producto de PCR desnaturalizado, 7 uL del marcador de ADN 100 pb G2101 (Promega, Madison, WI, USA), y al menos un producto de PCR sin desnaturalizar.

7 Desarrollar la electroforesis a 200 volts, 8°C, durante 8 h para el fragmento II (112pb) y durante 15 h para los fragmentos I y III, 419 pb y 378 pb respectivamente.

8 Teñir el gel con agitación durante 40 minutos con una mezcla de 200 mL de TBE 1X, pH 7.5 a 8 y 20 uL de SYBR Gold 10,000X, ó tinción, con plata (Creste *et al*, 2001)

9 Utilizar el sistema fotodocumentador para capturar la imagen del gel y almacenar la imagen utilizando el software de Microsoft Word 2003, cortar del gel las bandas de interés para su posterior purificación y secuenciación.

10 Evaluar el perfil electroforético de cada individuo como homocigoto o heterocigoto.

5.7 Cromatografía de Líquidos Desnaturalizante (DHPLC)

5.7.1 Reacción de PCR

Se amplificó las tres regiones polimórficas según lo indicado en 5.6.1.

5.7.2 Sistema Cromatográfico

Se utilizó un sistema cromatográfico HP1100 (Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) constituido por una bomba isocrática, horno de calentamiento, detector UV de longitud de onda variable, inyector automático, controlado por el software Chemstation 2D version A.09.3, detección UV a 260nm, una columna polimérica Helix DVB 50 mm * 3.0 mm (Varian, Inc. Lake Forest, California, USA), temperatura de acuerdo al tamaño del fragmento incluido en el programa MELT (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>), fue de 60°C para el fragmento I de 419 pb, 53°C para el fragmento II de 112 pb y 57°C para el fragmento III de 378 pb, fase móvil compuesta por 11% CH₃CN/0.1M TEAA, pH=7, flujo de 0.5 ml/min y volumen de inyección de 10 µL. El marcador de tamaño fue DH ladder (Bioline, London UK) con

fragmentos de 95 pb, 105 pb, 255 pb y 270 pb. Adicionalmente se utilizaron controles de haplotipos homocigotos y heterocigotos de ganado Beefmaster.

5.8 Secuenciación

Los templados utilizados para la reacción cíclica de secuenciación fueron productos de PCR purificados, plasmidos obtenidos de la clonación de pPCR y bandas aisladas de geles SSCP.

5.8.1 Purificación de Bandas provenientes del Análisis SSCP

Las bandas del gel de acrilamida fueron cortadas, removido el agente de tinción SYBR-gold y reamplificadas con los iniciadores y condiciones empleadas en el análisis de SSCP. Para purificar las bandas y acondicionar el templado para secuenciación, se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Cortar la banda del gel de poliacrilamida
2. Colocar la banda en columna A105 (Qiagen Inc., Valencia California, USA)
3. Centrifugar a 12,000 g/5min
4. Añadir al filtrado, acetato de sodio 3 M, pH 5.2 hasta obtener una concentración final de 300mM (10 uL).
5. Mezclar levemente en vortex
6. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío
7. Mezclar levemente en vortex

8. Incubar a -20°C / 15 min.
9. Centrifugar a 12,000 g/15min
10. Eliminar sobrenadante y lavar la pastilla con etanol frío al 70%
11. Centrifugar a 12,000 g/15min
12. Eliminar sobrenadante
13. Permitir secar la pastilla al aire y resuspender en 5 uL de agua esteril milli-Q
14. Realizar PCR (ver condiciones en Tabla 10)

5.8.2 Purificación de Productos de PCR

Se realizó secuenciación directa de productos de PCR aislando y purificando la banda del gel de agarosa, utilizando el mismo procedimiento empleado para las bandas de SSCP, también se utilizó purificación de los productos de PCR empleando ExoSAP-IT (USB Corp. Ohio , USA), el tratamiento se describe enseguida:

- 1 En un tubo cónico de 200ul, añadir 5 ul del pPCR y 2 ul de ExoSAP-IT
- 2 Mezclar y calentar a 37°C por 15 minutos
- 3 Calentar a 80°C por 15 minutos
- 4 Guardar a -20°C hasta su uso en la reacción de secuenciación.

5.8.3 Extracción y Revisión del ADN Plasmidico (Sambrook et al.,1989)

Las clonas seleccionadas (10 uL sin lisar) se crecieron en 3 mL de caldo LB conteniendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, a 37°C , con agitación durante 12h. Posteriormente

se realizó la extracción del ADN plasmídico mediante el siguiente procedimiento de lisis alcalina.

1. Una alícuota de 1.5 ml del cultivo se transfirió a un tubo cónico y centrifugó a 12000 rpm/5 min.
2. Se desechó el sobrenadante, tratando de eliminar la mayor cantidad del medio de cultivo y dejó la pastilla de bacterias tan seca como fue posible.
3. La pastilla se resuspendió en 100µl de solución I fría [50mM de glucosa, 25mM Tris.HCl (pH 8), 10mM EDTA (pH 8)]. Se utilizó el vortex para asegurar la resuspensión.
4. Se añadió 200µl de Solución II recién preparada (0.2N NaOH, 1%SDS) y mezcló por inversión. El tubo se dejó en hielo durante 5 min.
5. Fueron añadidos 150µl de solución III fría (60 ml de acetato de potasio 5M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua).
6. Se mezcló suavemente con un vortex y se incubó en hielo por 3-5 min.
7. Se centrifugó a 12000 rpm/ 5 min. a 4°C y transfirió el sobrenadante a otro tubo.
8. 500 ul de una solución de cloroformo-octanol (24:1) fueron añadidos, se mezcló al vortex y centrifugó a 12000 rpm/ 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio.
9. El DNA plasmídico se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol absoluto frío, mezcló por inversión e incubó la muestra 15 minutos a -20°C.
10. Se centrifugó a 12 000 rpm/ 15 min. Se eliminó el sobrenadante.
11. La pastilla se lavó suavemente con 500 uL de etanol al 70%, incubó a -20°C durante 15 minutos y centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y secó la pastilla a temperatura ambiente.

12. El DNA se resuspendió en 15µl de agua milli-Q esteril mediante el uso de un mezclador térmico para microtubos Eppendorf Thermomixer, a 500 rpm, 60°C/2h,

13. Se almacenó a -20°C hasta su revisión en gel de agarosa al 1.5% y uso en la reacción de secuenciación.

El análisis del ADN se llevó a cabo utilizando el Fotodocumentador EDAS 120 (Eastman Kodak Company. Rochester, N.Y. USA) con el programa computacional Gel-Imagen 1Digital Science. Fue depositado 5 uL de la muestra por pozo en un gel de agarosa al 1.0%, y se utilizó Sybr-gold como agente de tinción fluorescente (Zipper *et al.*, 2004), se observó que no existiera degradación del ADN.

5.8.4. Clonación

Los estuches de clonación utilizados fueron el TOPO XL (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) y pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA).

5.8.4.1 Clonación con el estuche TOPO XL

5.8.4.1.1 Reacción de Ligación

1. En un micro-tubo para PCR de 200 ul, se añadió: 4ul del producto de PCR, 1uL del Vector pCR-XL-TOPO
2. Se mezcló suavemente e incubó a temperatura ambiente por 5 min.
3. Se añadió 2uL de solución stop 6X y mezcló suavemente.
4. Se centrifugó a 10,000g/10 seg y colocó el tubo sobre hielo.

5.8.4.1.2 Transformación

1. Descongelar sobre hielo 50 μ L de células químicamente competentes (*E. coli* TOP10) por cada reacción de ligación
2. Añadir el producto de la ligación a las células competentes.
3. Mezclar suavemente
4. Incubar sobre hielo por 30 min.
5. Dar un choque térmico a 42°C/2 min.
6. Incubar sobre hielo por 2 min.
7. Añadir 250 μ L de medio SOC o LB y mezclar suavemente
8. Incubar a 37°C/1h a 300 rpm
9. Mantener los tubos sobre hielo
10. Por cada reacción de transformación, preparar 2 cajas petri con medio LB conteniendo 50 μ g/mL de kanamicina o 100 μ g/mL de ampicilina y dispersar por caja 50 μ L de XGal (20mg/mL) y 20 μ L de IPTG (0.1M), dejar reposar 30 minutos.
11. Dispersar 150 μ L de la reacción por caja petri.
12. Incubar a 37°C toda la noche

5.8.4.2 Clonación con el estuche pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA)

Reacción de Ligación

1. En un micro-tubo para PCR de 200 μ L, colocar:
 - 3.0 μ L Buffer T4 ligasa 2X: 3.0 μ L
 - 0.5 μ L Vector (50ng): 0.5 μ L
 - 2.0 μ L Fragmento de ADN a clonar
 - 0.5 μ L T4 ligasa

2. Incubar 1 h a temperatura ambiente

3. Incubar toda la noche a 4°C

Transformación

1. Transferir la reacción de ligación a un tubo de 1.5 mL

2. Descongelar sobre hielo las células competentes (JM109)

3. Añadir 25 µL de células competentes (JM109) a cada tubo con la reacción de ligación

4. Mezclar suavemente

5. Incubar en hielo 20 min

6. Dar un choque térmico a 42°C/50 seg

7. Incubar sobre hielo por 2 min.

8. Añadir 250 µL de medio SOC o LB y mezclar suavemente

9. Incubar a 37°C/1.5 h a 300 rpm

10. Mantener los tubos sobre hielo

11. Por cada reacción de transformación, preparar 2 cajas petri con medio LB conteniendo 100 µg/mL de Ampicilina y dispersar por caja 50 µL de XGal (20 mg/mL) y 20 µL de IPTG (0.1 M), dejar reposar 30 minutos.

12. Dispersar 125 µL de cada reacción por caja petri.

13. Incubar a 37°C toda la noche

Caracterización de recombinantes

1. Levantar 5 colonias positivas al inserto (blancas) de cada caja (10 colonias por fragmento) y resuspenderlas individualmente en 20 µL de agua milli-Q estéril.

2. Transferir 10 µL a un tubo para PCR

3. Lisar las células aplicando el siguiente programa de temperaturas en el termociclador:

96°C/5 min., 50°C/1.5 min., 96°C/1. min., 45°C/1.5min., 96°C/1min., 40°C/1min.

4. Preparar la siguiente mezcla para amplificar los fragmentos de ADN:

Tabla 12

Mezcla de reactivos para caracterizar recombinantes mediante PCR

COMPONENTE	Concentración μL	
Buffer M188J(Promega, Madison, WI, USA)	10X	2.0
Cloruro de Magnesio A351H (Promega, Madison, WI, USA)	0.5mM	0.7
Desoxi-tri-fosfato (dNTP's): (Promega, Madison, WI, USA)	10mM	0.2
^a Iniciador sentido M13 (24 mer): (Promega, Madison, WI, USA)	5uM	0.15
^b Iniciador anti-sentido M13 (22 mer): (Promega, Madison, WI, USA)	5uM	0.15
ADN Taq polimerasa M8295 (Promega, Madison, WI, USA)	5U/ μL	0.2
ADN (lisado)		10
Agua milli-Q esteril	----	6.6
Volumen total	----	20

^aM13F (24 mer): 5' (CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC) 3'

^bM13R (17 mer): 5' (CAGGAAACAGCTATGAC) 3'

5. Amplificar en el termociclador, los fragmentos de ADN con el siguiente programa de temperaturas: (94°C/1 min., 60°C/1 min., 72°C/1 min) durante 30 ciclos.

6. Revisar la amplificación en gel de agarosa al 2%: cargar cada pozo del gel con 10 μL del pPCR mezclados con 2 μL de una mezcla 1:1 de SYBR-Gold 100X (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR. USA): azul de bromotimol-xilen cianol (Promega, Madison, WI, USA). La electroforesis se realizó en una cámara Wide (Bio-Rad Laboratorios, Inc. Hercules Ca. USA), en amortiguador TBE 1X, aplicando un voltaje de 10 V/cm, durante 1 h. Para visualizar las bandas se utilizó el fotodocumentador EDAS 120, (Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y. USA) con el software 1D Image Analysis del mismo proveedor.

5.8.5 Reacción de Secuenciación

Se utilizó los reactivos incluidos en el estuche comercial Sequitherm Excell II (EPICENTRE, Madison, WI, USA).

5.8.5.1 Preparación de la muestra. En un tubo de 0.2 ml se preparó una mezcla de reacción con los siguientes componentes:

1. Iniciador M13F, 1.0 pmol/ml,

5'*800 CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC 3': 1.0 µl

2. Iniciador M13R, 1.0 pmol/ml,

5'*700 CAGGAAACAGCTATGAC 3': 1.0 µl

3. Regulador de secuenciación 3.6 µL

4. ADN polimerasa (Secuenasa) 0.5 µl

5. ADN templado (200ng/µL) 2.4 µl

Un grupo de 4 tubos de 0.2 ml se etiquetaron para cada una de las combinaciones iniciador/templado como A, C, G y T.

Se agregó 1.0 µL de la mezcla de terminación (dNTP's/ddNTP's) A al tubo A, la mezcla de terminación T al tubo T, etc.

Se agregó 2.0 µL de la mezcla de reacción a cada uno de los tubos A, C, T y G, se centrifugó a 12 000 rpm/15 seg.

El programa de temperaturas para la reacción de secuenciación fue el siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo
A 92	2 minutos
B 92	30 segundos

C 58 30 segundos

D 70 1 minuto

Repetir 30 ciclos B-D

E 72 7 minutos

F 4 5 minutos

Al término de la PCR, se agregaron 2 µL de la solución de paro (formamida 95%, EDTA 10 mM, 0.1% xilen cianol, 0.1% azul bromofenol, pH 11) a cada tubo, se centrifugó a 12000 rpm/30 seg. y se desnaturalizó a 95°C/5minutos. Al terminó de la desnaturalización la reacción se dejo en hielo o a -20 °C hasta cargar el gel de electroforesis.

5.8.5.2 Electroforesis

Aparato

1. Secuenciador Li-Cor (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA)

Reactivos y materiales

1. Amortiguador TBE 1X (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA)
2. Poliacrilamida 6.5% KB plus (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA)
3. Persulfato de amonio 10 % (Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. Toluca México)
4. TEMED Promega (Madison, WI, USA)
5. Cámara de electroforesis de 41 cm
6. Espaciadores y peine dientes de tiburón espesor 0.2 mm

Preparación del Gel de poliacrilamida

En un vaso de precipitado de 100 mL agregar 30mL de KB Plus 6.5%, 250uL de persulfato de amonio (PSA) al 10% y 25uL de TEMED, mezclar y llenar auxiliándose de vibración el espacio entre los dos vidrios de 41 cm previamente montados y con espaciador de 0.2mm, instalar el peine de 0.2 mm (al revés) y dejar polimerizar 1.5 h. Instalar la cámara de electroforesis en el secuenciador, aplicar 1.0 a 1.5 uL de la muestra por pozo, en el orden de ACGT. Las condiciones utilizadas para desarrollar la electroforesis en el secuenciador fueron : 1900V, 50 °C, durante 10 h.

Obtención de la Secuencia Nucleotídica

Terminada la corrida se analizó la imagen y electroferograma en el programa computacional eSEQ (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA) para obtener las secuencias nucleotídicas.

5.8.6 Análisis y Comparación de Secuencias

Las secuencias para las 5 razas de ganado bovino en las 3 regiones polimórficas del gen de la *MSTN*, fueron alineadas y comparadas con el programa DNASTAR Lasergene 8.0 (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA). Con el mismo programa se analizaron secuencias completas del gen de *miostatina* reportadas en la pagina del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para obtener las regiones más cambios en la secuencia de nucleotidos del gen.

6. RESULTADOS

6.1 Cuantificación de ADN

Los resultados de cuantificación de ADN por los métodos de análisis UV, fluorescencia y densitometría se encuentran en el apéndice C. Se observa la concentración y calidad del ADN extraído de las diferentes razas. Se seleccionó las muestras que presentaron mayor concentración y calidad de ADN.

6.2 Medición de Temperaturas de Disociación (T_m 's)

6.2.1 Amplificación del Fragmento de ADN

En la figura 1 se observa la gráfica de amplificación de ADN para un lote de muestras

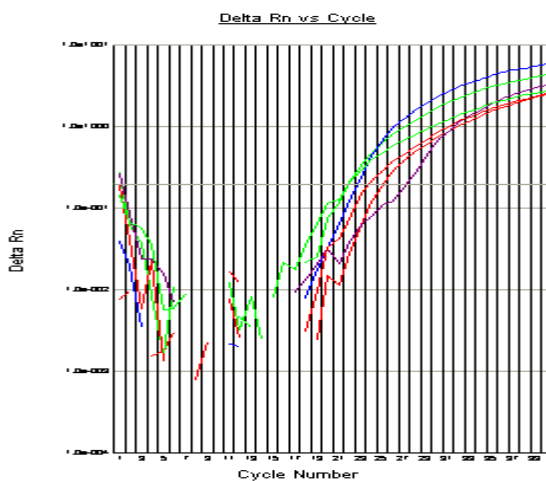


Figura 1. Amplificación del fragmento 1 de MSTN de 112 pb. Se grafica Delta Rn (fluorescencia normalizada del reportero SYBR green) contra el ciclo de la reacción de PCR.

6.2.2 Haplotipos de Referencia y Muestras de ganado Beefmaster y Chianina

La temperatura de disociación para las muestras de referencia y muestras de ganado Chianina, Simmental y Beefmaster, se encuentran en el Apendice D.

En la tabla 13 se anotan las temperaturas de disociación para las muestras con haplotipo conocido de ganado de Beefmaster del fragmento 2 del gen MSTN, determinadas utilizando SYBR Green I, se observa que existe una diferencia significativa entre las Tm's de los haplotipos mutados y el haplotipo normal.

Tabla 13

Temperaturas de disociación (Tm's) para las muestras control

Haplotipo	Mutación	Tm's °C	P (n=4)
AA	Normal	72.32	
BB	del. T	71.94	3.8
CC	T>C, G>A, del T	71.66	6.0
AB	del. T	71.92	4.3
AC	T>C, G>A, del.T	71.66	6.6

$t_{0.95}=2.35$

En la figura 2 se observa el perfil de Tm's para los grupos mutado y no mutado.

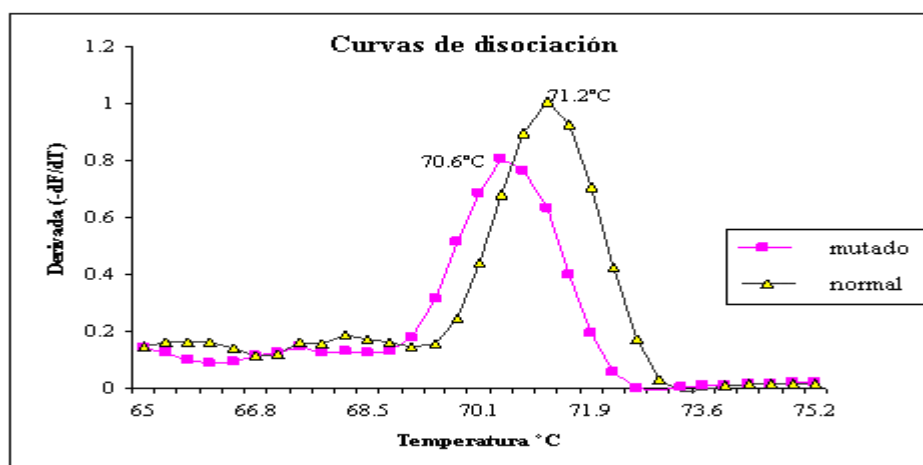


Figura 2a

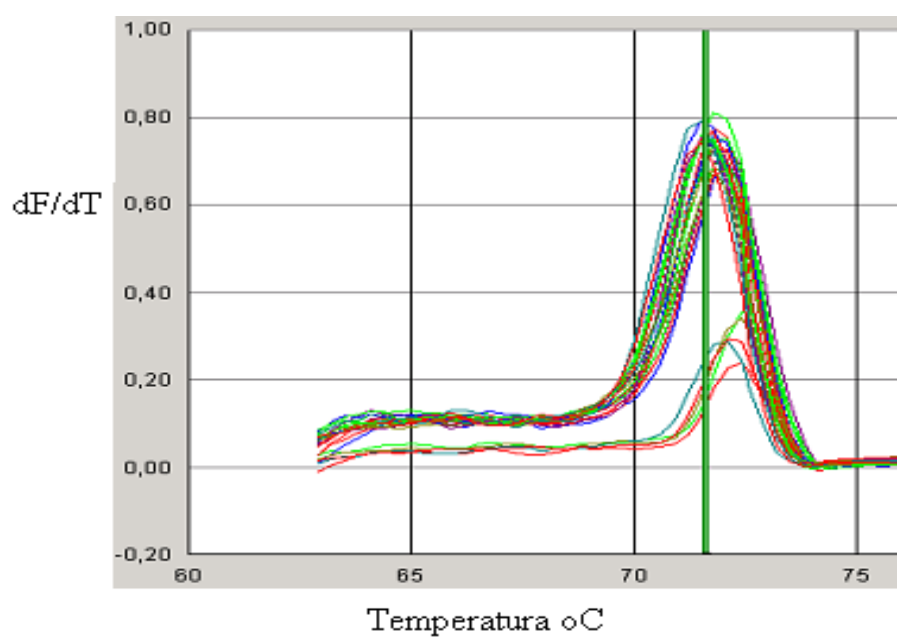


Figura 2b

Figura 2

Perfil de Tm's del alelo mutado y alelo normal del fragmento nucleotídico de 112 pb, del gen MSTN. En la figura 2a se observa el perfil de Tm's promedio. En la figura 2b se observa el perfil de Tm's sobrepuesto para un grupo de muestras con alelo normal y alelo mutado.

6.2.3 Estadística de la Medición de Tm's

En la figura 3 realizada mediante el programa SPSS versión 10.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago Illinois, USA) se utiliza una gráfica de caja para representar la dispersión de los valores de las Tm's y el número correspondiente de muestras para cada genotipo, se observa los rangos de Tm's para el grupo de individuos con genotipo normal y para el grupo de individuos con genotipo mutado.

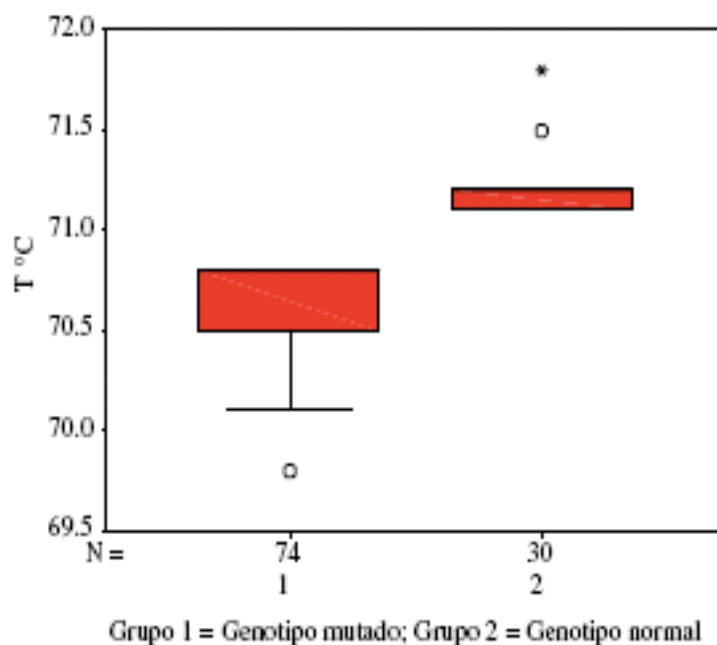


Figura 3

Gráfica de caja donde se observa la dispersión de las temperaturas de disociación para los grupos designados como mutado (69.8 °C -70.8 °C) y normal (71.1 °C -71.8 °C).

La prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney permitió establecer la diferencia entre las temperaturas de disociación (Tm's) del grupo de individuos con

haplotipo normal y el grupo de individuos con haplotipo mutado, se acepta la hipótesis alternativa, como la diferencia entre los grupos analizados. (tabla 14)

Tabla 14

Prueba estadística no paramétrica de Mann Whitney.

Grupo	N	Rango (medias)	Rango (suma)
1	74	37.5	2775
2	30	89.5	2685
total	104		

Estadístico: Mann-Whitney U = 0.0.

Nivel de significancia 5%

Los resultados obtenidos mediante la medición de Tm's fueron comparados con los obtenidos mediante el método de BESS en 61 muestras, de las cuales 31 muestras presentaron alguna mutación, siendo 29 muestras detectadas con el método de medición de Tm's, con una correspondencia entre ambos métodos del 93.5% (tabla 15), lo cual verifica la asignación del grupo con alelo mutado y su frecuencia de variación del 71.1% respecto al total de muestras analizadas.

Tabla 15

Variaciones nucleotídicas determinadas en la fragmento II, nt 2293 a nt 2404 de la secuencia del gen de la MSTN (Genbank: AF_320998.1) mediante las técnicas de medición de Tm's y BESS.

Método Tm's		Método BESS		Comparación		
^a No	^b Cambio	^a No.	^b Cambio	^c Tm's & BESS	Discrepancias	Concordancia
nt	nt	nt	nt			(%)
104	74	61	31	29	2	93.5%

^aNo = Número de muestras analizadas

^bCambio = Número de muestras con algún cambio en la secuencia.

^cTm's & BESS= Número de muestras que coincidieron por ambos métodos con algún cambio en la secuencia.

6.3 Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP)

6.3.1 Amplificación de Fragmentos del Gen de *Miostatina*

En el apéndice E se observa la amplificación de los fragmentos de ADN 1 (419 pb), 2 (112 pb) y 3 (378 pb) para ganado de la raza Chianina.

6.3.2 Detección de Variantes

En las siguientes figuras obtenidas de los geles SSCP en las regiones del gen de la *MSTN*, se observa para la misma muestra, homocigoto en un fragmento y heterocigoto en otro fragmento del gen.

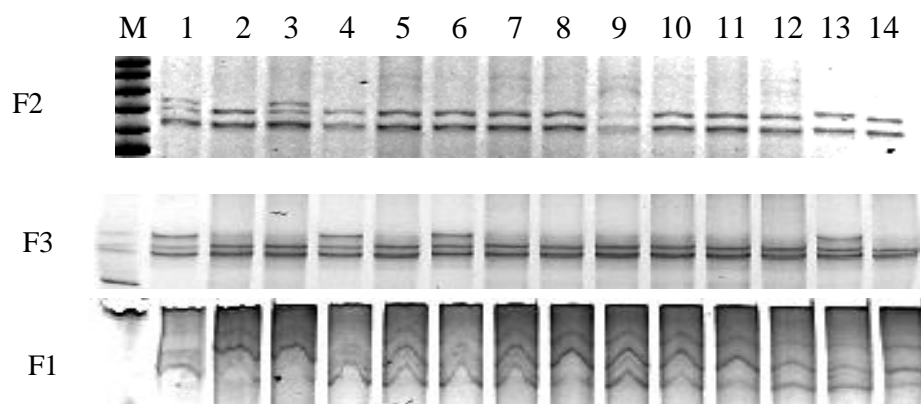


Figura 4 SSCP del fragmento 1, 2 y 3 del gen MSTN en gel poliacrilamida 0.8X, pH=8, TBE 0.5X, 8°C, para el ganado bovino de la raza Chianina. se observa la frecuencia de heterocigotos del fragmento 1 de 9/14, en el fragmento 2 de 3/14, y en el fragmento 3 de 4/14.

Raza Limousin

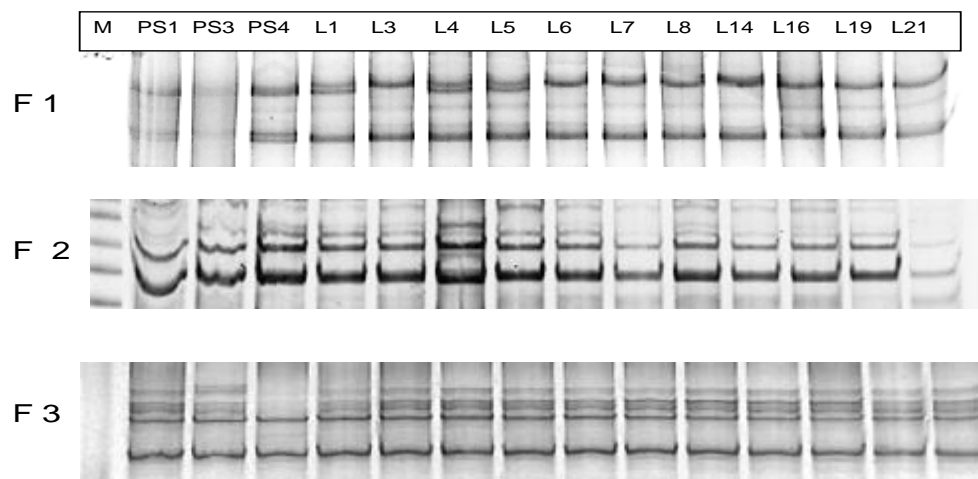


Figura 5 Perfiles electroforéticos SSCP para muestras de Ganado Limousin, se observa que la frecuencia de heterocigotos para el fragmento 1 de 5/14, en el fragmento 2 de 7/14, y en el fragmento 3 de 13/14.

En la tabla 16 se observan los perfiles SSCP encontrados para los 3 fragmentos del gen MSTN en diferentes razas de ganado bovino. Se distingue en mayor medida las variaciones entre homocigotos y heterocigotos, que entre homocigotos solamente.

Tabla 16
Resumen de perfiles electroforéticos de SSCP en razas de ganado bovino de carne

*Pe	Chianina			Simmental			Brahman			Limousin		
	Fragmento			Fragmento			Fragmento			Fragmento		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
+/+	5	11	10	12	14	14	14	14	11	9	7	1
+/-	9	3	4	2	0	0	0	0	3	5	7	13
-/-	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*perfil de electroforésis

6.4 Cromatografía de Líquidos Desnaturalizante (DHPLC)

6.4.1 Estándar de Tamaño

En la figura 6 se observa el cromatograma del estándar usado como referencia de tamaño en la técnica de DHPLC. Los fragmentos pequeños de 95pb y 105pb no fueron adecuadamente separados. Solamente los fragmentos de 255 y 270pb fueron separados.

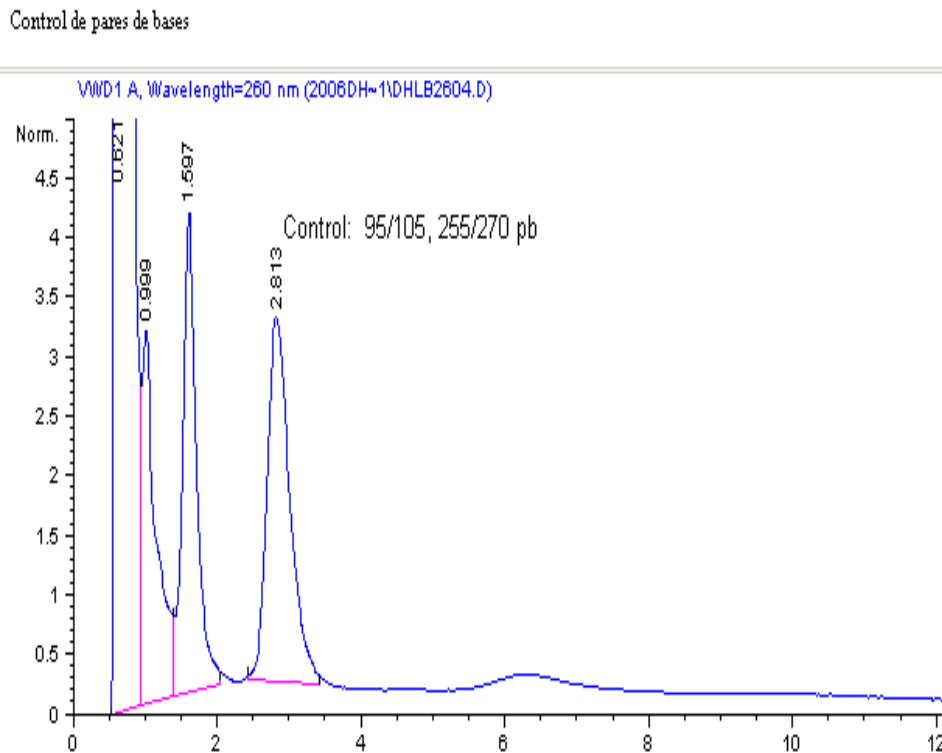


Figura 6. Estándar para verificar la separación por tamaño de los fragmentos nucleotídicos. Se observa la separación de los fragmentos 255pb y 270pb.

6.4.2 Haplotipos de Referencia

Se analizaron 5 haplotipos de ganado Beefmaster, de acuerdo al cromatograma de la figura 7.

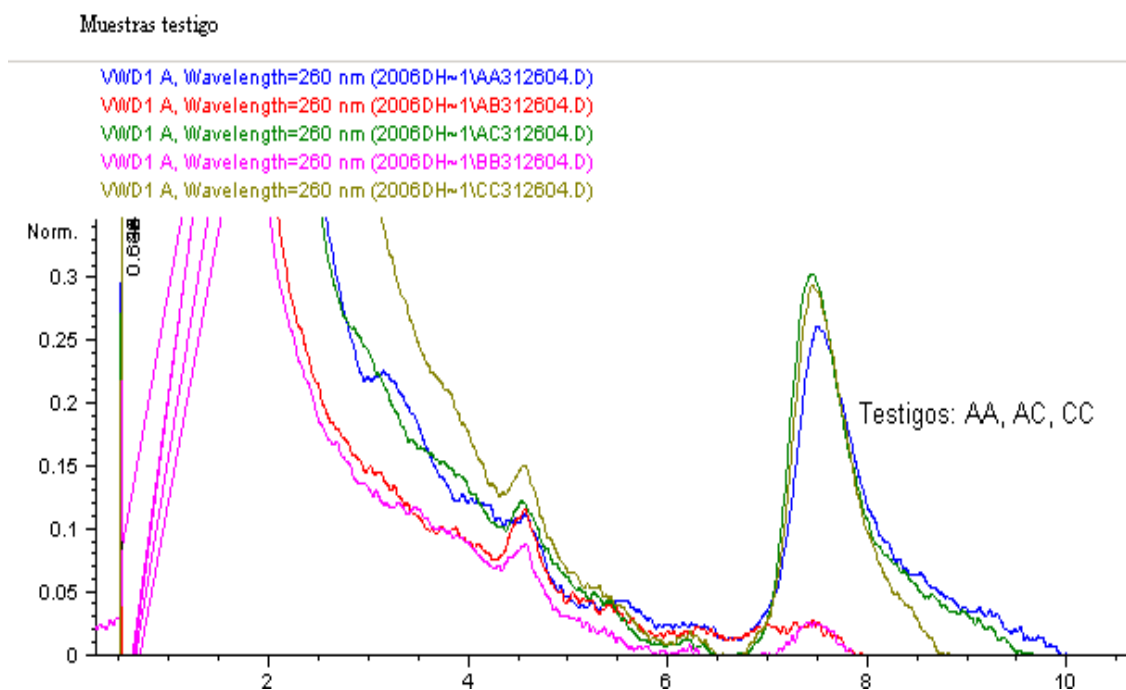


Figura 7. Cromatograma de diferentes haplotipos de ganado Beefmaster. Se utilizó el fragmento 3 de 378pb del gen MSTN.

6.4.3 Análisis de Muestras

Se utilizaron muestras de ganado de la raza Chianina para analizar el fragmento 3. El cromatograma correspondiente se observa en la figura 8.

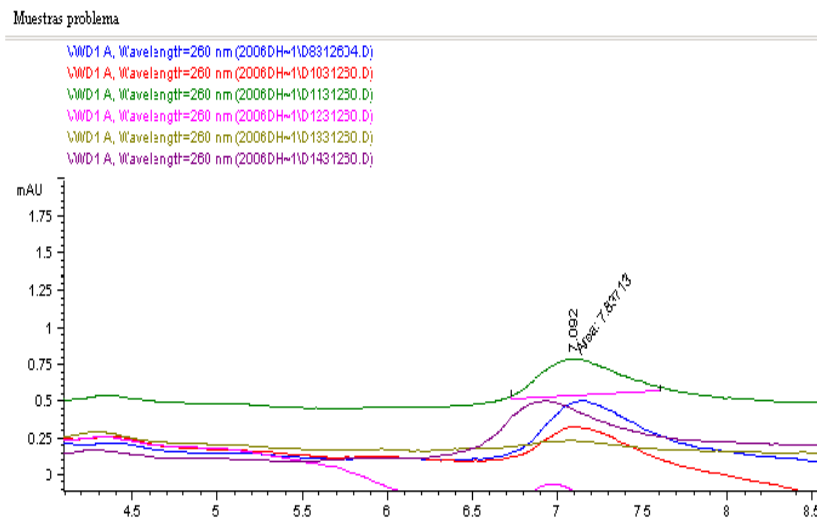


Figura 8. Cromatograma DHPLC de muestras de ganado Chianina, fragmento 3 del gen *MSTN*. Se observa diferencia en el tiempo de retención para la muestra 14.

6.5 Secuenciación

6.5.1 Tamizaje de clonas

Los productos de PCR del fragmento 2 (112pb) clonados y la selección de las clonas con inserto se realizó mediante PCR con los iniciadores M13. En la Figura 9 se observa la imagen del tamizaje de las clonas de dos razas de ganado.

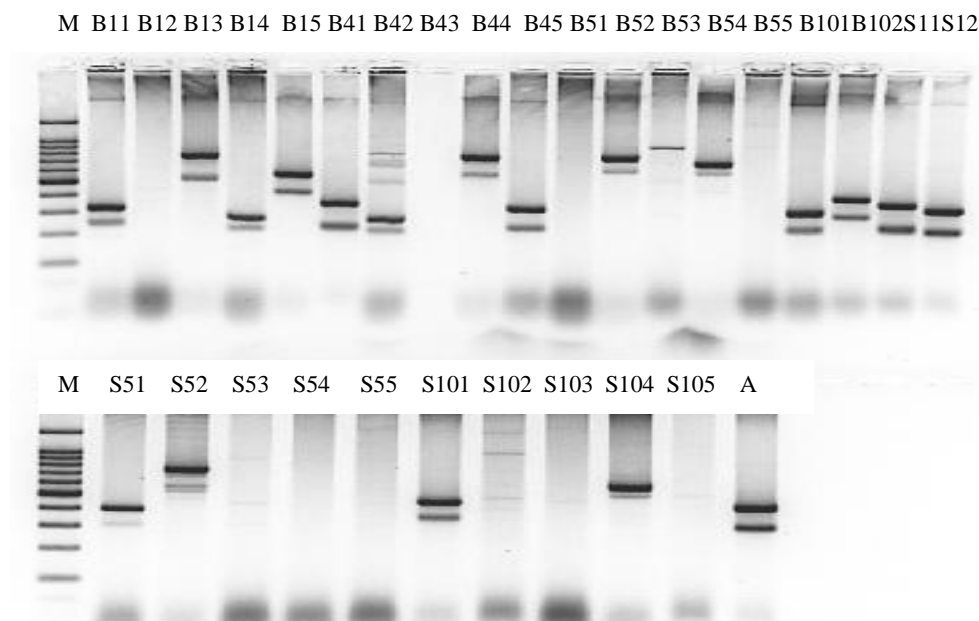


Figura 9 Tamizaje de clonas de ganado Brahman y Simmental
M=marcador 100pb, B= Brahmán, S= Simmental, A=vector

6.5.2 Extracción de ADN Plasmídico

Posterior al tamizaje de las clonas, se realizó el cultivo y extracción de ADN plasmídico. En la Figura 10 se observa en las diferentes muestras, una concentración de ADN plasmídico variable, sin degradación.

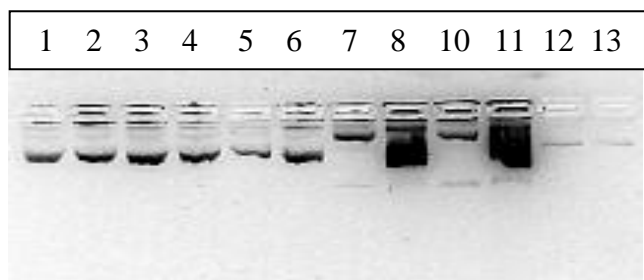


Figura 10 ADN plasmídico. Muestras de ganado Chianiana, clona D5: 1 a 8; muestras ganado Chianina, clona D9: 10 A 13. Gel de Agarosa 1%, teñido con Sybr-gold.

6.5.3 Análisis y Comparación de Secuencias

En la Tabla 17 se observa las variaciones nucleotídicas para los fragmentos 1 y 3. En el fragmento 1 se encontraron 7 variaciones nucleotídicas, todas en ganado Limousin y solo una en ganado Brahman. En el fragmento 3 se obtuvieron 6 variaciones en el ganado Chianina y 1 variación en ganado Simmental. En la Tabla 18 se localizan las variaciones nucleotídicas para el fragmento 2, encontradas en ganado Brahman, Simmental y

Chianina. **Tabla 17**

Variaciones nucleotídicas en los fragmentos 1 y 3 del gen de la *miostatina*

Fragmento	*Secuencia	Variación nucleotídica	Ganado
1	GACTA GAAG	159 A>T	Limousin
1	AGGCTCCTC	252 T>C	Limousin
1	CCTCCACTC	257 C>A	Limousin
1	CCACTCCTG	260 T>A	Limousin
1	TGGA AACTGA	267 A>G	Limousin Brahman
1	AG TTCGATG	282 C>A F94L	Limousin
1	GGCTCCTTG	324 C>T	Limousin
3	AGTTTCTTTC	748-77_78 ins T	Simmental
3	TTGAGG TAGG	748-52 G>A	Chianina
3	AGTTCTTTCT	748-78 C>T	Chianina
3	TCTTTAATAAT	748-70 A>T	Chianina
3	TCGTTACCCTC	854 A>T	Chianina
3	TTTCCATACAG	748-6 A>G	Chianina
3	TTTTGGGATC	748-36 G>T	Chianina

*GenBank AF3209981.

Tabla 18

**Variaciones nucleotídicas en el fragmento 2 del gen de la
*miostatina***

Fragmento	*Secuencia	Variación nucleotídica	Raza de ganado bovino
2	GATTGATAT	374-69 G>C	Brahman
2	CCCAAATGT	408 T>C	Simmental
2	GTAAC TTT TTT TTT -CTTA	374-16_17 ins T	Simmental
2	TCTTATTCAT	374-13 A>C	Chianina
2	TTCTAA CGC	384_385 ins A	Chianina
2	TGTT CGTT	374-55_56 ins T	Brahman
2	CGTTCATTTTTC	374-50 A>G	Chianina, Simmental

* GenBank AF3209981

En la Figura 11 se observa el perfil de SNP's para el gen de MSTN de ganado bovino, los polimorfismos de un solo nucleótido se localizan principalmente al inicio del Intron 1 y en el Exón 3. Se utilizaron los genes de MSTN completos, reportados en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

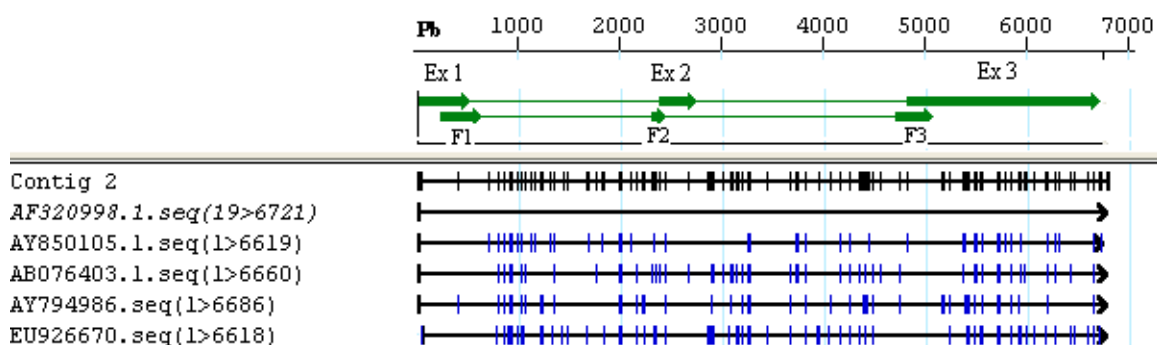


Figura 11. Perfil de SNP's en el gen de MSTN. Se observan las regiones de los tres Exones (Ex1, Ex2, Ex3) y de los fragmentos(F1, F2, F3). La secuencia de referencia utilizada fue AF320998 (*Bos taurus*); AY850105 (Raza Beefmaster); AB076403 (*Bos taurus* negro japonés); AY794986 (*Bos indicus*); EU926670 (*Bos grunniens*, Yak domestico)

En las Figuras 12, 13 y 14, se representan los cambios encontrados en la secuencia de nucleótidos de cada uno de los fragmentos estudiados. En el Fragmento 1, no se encontró cambios en la raza de bovinos Chianina, Simmental, ni se reportan para Beefmaster. En el ganado Limousin se encontraron varios cambios, incluyendo la mutación F94L, asociada con el fenotipo de doble musculatura, (Dunner, 2003), las transiciones silenciosas 267 A>G y 324 C>T. En ganado Brahman se encontró una transición en el nucleótido 267 con el cambio A>G.

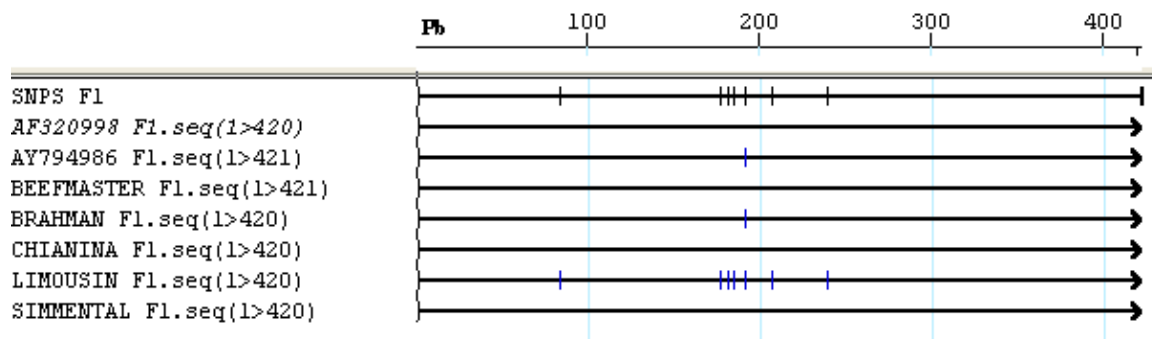


Figura 12. Perfil de variación en la secuencia del fragmento 1 del gen de MSTN. AF320998 es la secuencia de referencia *Bos taurus*, AY794986 secuencia *Bos indicus*.

En la figura 13, correspondiente al fragmento 2, se observa la variación encontrada para las razas Brahman, Chianina y Limousin,

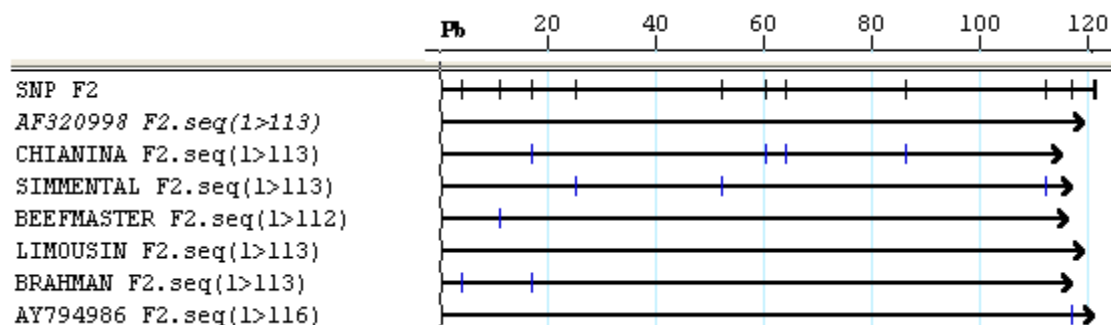


Figura 13. Perfil de variación en la secuencia del fragmento 2 del gen de MSTN. AF320998 es la secuencia de referencia *Bos taurus*; AY794986 secuencia *Bos indicus*.

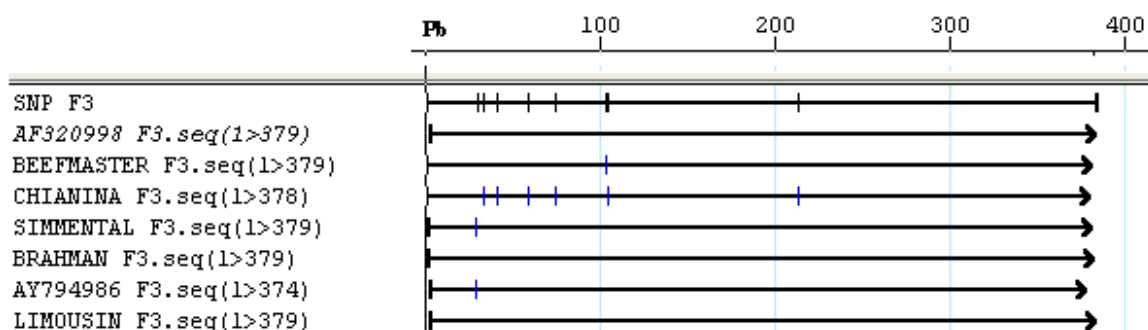


Figura 14. Perfil de variación en la secuencia del fragmento 3 del gen de MSTN. AF320998 es la secuencia de referencia *Bos taurus*; AY794986 secuencia *Bos indicus*.

7 DISCUSIÓN

7.1 Medición de Tm's

Si la Tm es diferente para los productos de PCR amplificados en las mismas condiciones, se puede inferir que se tiene variaciones nucleotídicas. La evaluación del método se inició amplificando un fragmento de ADN de 548 pb, correspondientes al exón II de la miostatina, utilizando muestras de ADN de haplotipos conocidos en ganado Beefmaster (De la Rosa, 2003). Posterior a la optimización de la reacción de PCR se obtuvieron las temperaturas de disociación para cada haplotipo, no observando una diferencia significativa en los Tm para cada haplotipo. La medición de Tm's de los 5 haplotipos en el fragmento de 112 pb, permitió encontrar una diferencia significativa de temperatura entre el haplotipo normal o silvestre y los haplotipos mutados, no encontrándose diferencia en la Tm entre los haplotipos mutados. Por lo cual estos resultados nos indican que, de la manera como se procedió, solo es posible distinguir entre el haplotipo silvestre y mutado. En estos experimentos se utilizó aditivos recomendados en la literatura como la urea y formamida, (Kojo *et al.*, 2001; Talavera *et al.* 1999, Maruyama *et al.*, 2003), sin lograr diferenciar los haplotipos, por lo cual se utilizó las condiciones de disociación sin estos aditivos para las demás muestras. Con la prueba estadística de Mann Whitney se demostró que la medición de Tm's puede

distinguir entre individuos normales y mutados y la concordancia del 93.5% con el método de BESS nos indica que coinciden ambos métodos en la asignación del haplotipo mutado y normal.

7.2 Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP)

Inicialmente se utilizó la técnica de SSCP para separar polimorfismos y mutaciones silenciosas (Orita *et al.*, 1989) y ha sido utilizada como tamizaje de muestras para identificar mediante otra técnica como secuenciación la posición y tipo de cambio en la secuencia de nucleótidos (Dunner *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005). En el caso del fragmento 1 de 419 pb la optimización de las condiciones para separar las cadenas sencillas, fue mas tardado que para los fragmentos 1 y 2, así mismo se reporta una menor resolución para distinguir variaciones nucleotídicas en fragmentos mayores a 400 pb (Ahsen *et al.*, 2001). Las razas que presentaron mayor frecuencia de heterocigotos en los tres fragmentos fueron Chianina y Limousin. Este método permitió aislar bandas que posteriormente se utilizaron par determinar la variación nucleotídica mediante secuenciación. El método de SSCP es más laborioso pero una vez optimizado, permite diferenciar homocigotos de heterocigotos con mayor precisión que el método de medición de Tm's.

7.3 Cromatografía de Líquidos Desnaturalizante (DHPLC)

La técnica de DHPLC se ha utilizado para Los resultados obtenidos con ésta técnica, fueron poco informativos debido a la baja resolución durante la separación de los haplotipos de ganado Beefmaster. Esta resolución es atribuida al uso de condiciones isocráticas para el desarrollo de la cromatografía, ya que se reporta utilizar equipo en modo gradiente (Randall et al., 2005) Dentro de las muestras de ganado Chianina analizadas con ésta técnica, se encontró una muestra con un tiempo de retención diferente al resto de las muestras, lo cual nos indica baja sensibilidad para detectar variaciones nucleotídicas. El método de DHPLC se reporta como un método de moderado a alto rendimiento y con una sensibilidad mayor al 95% en la identificación de fragmentos de genes con variaciones nucleotídicas. (Weber *et al.*, 2004; Jones et al., 1999).

7.4 Secuenciación

Las variaciones nucleotídicas encontradas en el fragmento 1, incluyen la mutación característica del ganado Limousin F94L (Esmailizadeh *et al.*, 2008; Dunner *et al.*, 2003; Grobet *et al.*, 1998), 6 variaciones sinónimas en la región codificante. La variante nt267 A>G se encontró en ganado Brahman y Limousin, reportada para *Bos indicus* y *Bos taurus* (Dunner *et al.*, 2003; Tania *et al.*, 2006). La transición nt324 C>T y nt 267 A>G es reportada en la raza Frances Aubrac, y la nt267 A>G en la raza Blonde d'Aquitaine (Dunner 2003).

Se observaron 7 variaciones nucleotídicas del fragmento 2, incluyeron 5 en la región no codificante del Intrón 1 (2 transversiones, 1 transición, 2 inserciones), en la región

codificante del exón 2, se encontró una transición (408 T>C) y una inserción (384_385 ins A)

En el fragmento 3 se obtuvieron 7 variaciones, 6 en la región no codificante (3 transiciones, 2 transversiones, 1 inserción), y 1 en la región codificante (854 A>T).

CONCLUSIONES

La medición de Tm's es una herramienta molecular de moderado rendimiento que discriminó entre individuos silvestres y con variaciones nucleotídicas o mutaciones.

El análisis SSCP permitió diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, resultó ser un análisis no tan rápido como la medición de Tm's pero si más preciso, requiere de una optimización según las características del fragmento nucleotídico.

El análisis por DHPLC utilizado para detectar variaciones en la secuencia de nucleótidos, requiere de instrumentación y condiciones analíticas especiales para distinguir las variantes homoduplex de heteroduplex.

Mediante secuenciación se logró determinar la posición y tipo de nucleótido involucrado en la variación. El costo del análisis se compensa por el grado de exactitud y confianza al asignar los cambios en la secuencia de nucleótidos. Mediante ésta técnica se logró determinar cambios en la secuencia del gen MSTN, no reportados en ganado de carne.

La variación encontrada en los fragmentos del gen de MSTN monitoreados en las diferentes razas de carne, permitió confirmar lo polimórfico del gen y lo característico de algunas variantes como la F94L en el ganado Limousin.

Se recomienda verificar si la medición de Tm's y DHPLC puede ser optimizada para monitoreo poblacional y de alto rendimiento para una sola mutación, ya que son metodologías más baratas y rápidas que la medición mediante secuenciación.

LITERATURA CITADA

Ahsen vN, Oellerich M, Schütz E. 2001. Limitations of genotyping based on amplicon melting temperature. *Clinical Chemistry*. 47:1331-1332

Anollés CG, Gresshoff MP. 1997. DNA markers: protocols, applications, and overviews. Library of Congress. USA.

Applied Biosystems. 2002. Increased productivity of the ABI Prism 3100 Genetic Analyzer using One Polymer and One Array Length for multiple applications. Publication: 106AP07.

Arnold H, Della FM Anne CA, Baile CA. 2001. Review of myostatin history, physiology and applications. *Int. Arch. Biosci*. 1014–1022

Barber R, Wlodarczyk B and Kenyon J. 2000. High throughput screening of single nucleotide polymorphisms (SNPs) using the BESS-T&G Base Reader Kit and the ABI PRISM 3700 DNA sequencer. *Epicentre Forum* 7:1-3

Bellinge RHS, Liberles DA, Iaschi SPA, O'Brien PA, Tay GK. 2005. Myostatin and its implications on animal breeding. *Animal Genetics* 36:1-6 .

Bohling SD, King TC, Wittwer CT, Kojo SJ, Elenitoba JK. 1999. Rapid simultaneous amplification and detection of the MBR/JH chromosomal translocation by fluorescence melting curve analysis. *American Journal of Pathology*. 154:97–103

Buzin CH, Wen CY, Nguyen VQ, Nozari G, Mengos A., Li X., Chen JS., Liu Q., Gatti RA., Fujimura FK., and Sommer SS. 2000. Scanning by DOVAM-S detects all unique sequence changes in blinded analysis: Evidence that the scanning conditions are generic. *Biotechniques* 28:746–753.

Casas E, Bennett GL, Smith TPL, and Cundiff LV. 2004. Association of myostatin on early calf mortality, growth, and carcass composition traits in crossbred cattle. *J.Anim.Sci.* 82:2913–2918.

Casas E, Shackelford SD, Keele J, Koohmaraie M, Smith TPL, Stone RT. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J.Anim.Sci.* 81:2976-2983.

Challenger A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Conabio, UNAM, Agrupación Sierra madre, A.C., México. 25-71

Creste S, Truman IA, Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:299–306

De la Rosa Reyna X F. 2003. Evaluación de regiones asociadas a ganancia de peso en el genoma de individuos de la raza Beefmaster. *Tesis de maestría*, Centro de Biotecnología Genómica del IPN Reynosa Tamaulipas México.

DeFrancesco L, Perkel JM. 2001. In search of genomic variation. *The Scientist* 15:24.

Dunner S, Miranda ME, Amigues Y, Cañón J, Georges M, Hanset R, Williams J, Ménissier F. 2003. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. *Genet.Sel.Evol.* 35:103–118.

Dvorák J, Filistowicz A, Hruska D, Horák P, Vrtková I, Kúbek A, Szulc T, Pomichal S. 2002. The polymorphism of MSTN, PRNP and CSN3 genes in charolais cattle. *Animal Sci. Papers and Reports.* 20:19-23.

Esmailizadeh AK, Bottema CDK, Sellick GS, Verbyla AP, Morris CA, Cullen NG, Pitchford WS. 2008. Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits. *J. Anim Sci.* 86:1038-1046

Fahrenkrug SC, Casas E, .Keele JW. and .Smith.TPL. 1999. Technical note: Direct genotyping of the double-muscling locus mh in piedmontese and Belgian blue cattle by fluorescent PCR. *J.Anim.Sci.* 77:2028-2030.

Frayling IM. 2002. Methods of molecular analysis: mutation detection in solid tumours. J Clin Pathol: Mol Pathol. 55:73-79.

Frueh FW, and Noyer WM. 2003. The use of dematuring high-performance liquid chromatography DHPLC for the analysis of genetic variations impact for diagnostic and pharmacogenetics. Clin.Chem.Lab.Med.41:452-461.

Gallardo JL. 2006. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de bovino en México. Disponible en el sitio de red: http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg_perspectivas. [revisado 03 Jul. 2009].

Gasque R, Posadas E. 2001. Razas de Ganado Bovino en México. FMVZ-UNAM. Disponible en el sitio de red: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/enlinea/bovinos/intro.htm> [Revisado el 03 de Agosto 2009].

Gill LJ, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P. 2008. Associations between the 11 bp deletion in the *myostatin* gene and carcass quality in Angus-sire cattle. Animal Genetics 40:97-100.

Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. Nat. Genet. 17:4-5

Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, Ménissier F, Zanotti M, Dunner S, Georges M. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the *myostatin* function and causing double-muscling in cattle. Mamm Genome. 9:210-213.

Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J and Wittwer CT. 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. Clinical Chemistry 49:396-406.

Guzmán RME, Tirado LQ. 1993. *Métodos estadísticos no paramétricos*. 1ª edición, Universidad Autónoma de Chapingo, Mexico. pp. 97-106.

Haegeman A., Williams J.L., Law A., Van Zeveren A., and Peelman L.J. 2003. Mapping and SNP analysis of bovine candidate genes for meat and carcass quality. *Animal Genetic*, 34, 349-353

Hill BJ, Zerr T, Browers E, Greene AE, Comai L, Henikoff S. 2006. High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by Ecotulling. *Nucleic Acids Research* 34:13-99

Jeanplong F, Sharma M, Somers WG, Bass JJ, Kambadur R. 2001. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Mol. Cell. Biochem.* 220:31-37.

Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank G.R, Willis GM., Gerrard DE, Depreux FFS and Spurlock ME. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *The American physiological Society* 0363-6119/98

Jin S, McPherron AC. 2004. Methods for detection of mutations in myostatin variants. US patent. Application No. 967089, 1997-11-10. The Johns Hopkins University School of Medicine

Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC. 1999. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clinical Chemistry* 45:1133-1140

Kambadur R, Sharma M, Smith T, P.L and Bass John J. 1997. Mutations in myostatin GDF8 in double-muscling Belgian blue and piedmontese cattle. *Genome Research* . 7, 910 – 916

Karim L, Coppieters W, Grobet L, Valentini A, Georges M. 2000. Convenient genotyping of six myostatin mutation causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Animal Genetics* 31:396–399-

Kojo S, Elenitoba JK, Bohling SD. 2001. Solution-based scanning for single base alterations using a double stranded DNA binding dye and fluorescence melting profiles. *Am J Patho* 159 :845-853.

Laughlin AM, Waldron DF, Craddock BF, Engdahl GR, Dusek RK, Huston JE, Lupton CJ, Ueckert DN, Shay TL, Cockett NE. 2003. Use of DNA Markers to determine paternity in a multiple sire mating flock. *Sheep & Goat Research Journal* 18:14-17

Lee SJ and McPherron AC. 2001 Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:9306-9311.

Lee SJ, McPherron AC. 2004. Methods for detection of mutations in myostatin variants. US patent. Application No. 967089, 1997-11-10. The Johns Hopkins University School of Medicine

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, and Wittwer C. 2004. Genotyping of single-Nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry.* 50:1156-1164.

Marchitelli C, Savarese MC, Crisá A, Nardone A, Marsan PA and Valentini A. 2003. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mamm Genome.* 14:392-5.

Maruyama T, Takata T, Ichinose H, Park LC., Kamaiya N., Goto M. 2003. Simple detection of point mutations in DNA oligonucleotides using SYBR Green I. *Biotechnol Lett.* 25:1637-41.

McPherron AC, Lee SJ. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the *myostatin* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12457-12461

Miranda ME, Amigues Y., Boscher MY, Ménessier F, Cortés O, Dunner S. 2002. Simultaneous geneotyping to detect myostatin gene polymorphism in beef cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 119:361-366.

National Center for Biotechnology Information. NCBI Disponible en el sitio de red: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Revisado el 03 de Agosto 2009].

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi Kenshi, and Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2766-2770.

Pan Kai-feng, Liu Wanguo, Lu You-Yong, Zhang Lian, Li Zhen-pu, Lu Wan-Li, Thibodeau Stephen N, You Wei-Cheng. .2003. High throughput detection of microsatellite instability by denaturing high-performance liquid chromatography. *Hum Mutat* 22:388-394.

Pariset L, Cappuccio I, Marsan PA, Dunner S, Luikart G, Ruff GO, Peter C, Marletta D, Pilla F, Valentini A.2006. Assessment of population structure by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in goat breeds. *J. Chromatogr.B.* 833:117-120

Pogue R., West S., and Bushby K. 1998. Multiplex SSCP and heteroduplex analysis with southern hybridization for large-scale mutation detection. *Genomics* 54:1-4.

Potts JK, Echternkamp SE, Smith T.P.L, and Reecy M. 2003. Characterization of gene expression in double-musclcd and normal-musclcd bovine embryos. *Animal Genetics*, 34, 438-444.

Pozzi A, Galli A, and Bongioni G. 2004. Real time TaqMan PCR technique: a valid tool for the meat quality certification. Milano - Italy XXXIX Simposio Internazionale di Zootechnia "Meat Science & Research", 10 Giugno 2004, Roma

Randall PL, Coldham NG and Woodward MJ. 2005. Detection of mutations in *Salmonella enterica* *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) using standard HPLC instrumentation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:619-623.

Rudi K, Skanseng B and Dromtorp M. 2005. Explorative screening of complex microbial communities by real-time 16S rDNA restriction fragment melting curve analyses. *BioTechniques* 39:116-121

Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, N.Y., USA, pp 17-20.

Sasazaki S, Itoh K, Arimitsu S, Imada T, Takasuga A, Nagaishi H, Takano S, Mannen H, Tsuji S. 2004. Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Science* 67:275-280

Sasazaki S, Mutoh H, Tsurifune K, Mannen H. 2007. Development of DNA markers for discrimination between domestic and imported beef. *Meat Science* 77:161-166

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2003. Disponible en el sitio de red: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderito/sistprodres.htm> [Revisado el 03 de Agosto 2009].

Serrano MG, Egito AA, McManus C, Mariante AdaS. 2004. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. *Pesq. Agrop. Bras.* 39:543-549

Snelling MW. 2007. A physical map of the bovine genome. *Genome Biol.* 8:R165

Sonstegard TS, Van Tassell CP. 2004. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. *Genet. Res. Camb.* 84:3-9

Talavera EM, Afkir M, Salto R, Vargas AM, Alvarez Pez JM. 1999. 2nd Internet Conference on Photochemistry and Photobiology. Disponible en el sitio de red: <http://www.photobiology.com/index.htm> [revisado 03 Jul. 2009].

Taylor GR. 1997. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. CRC Press. USA

Tellgren A, Berglund AC, Savolainen P, Janis CM, Liberles DA. 2004. Myostatin rapid sequence evolution in ruminants predates domestication. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33:782-790

The bovine genome sequencing and analysis consortium. *et al.* 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324,522.

Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, Patel S, Umblas N, Mirel D, Higuchi R, and Germer S. 2005. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. *BioTechniques* 39:885-893

Weber J, Barbier V, Berhouet SP, Moncoutier VC, Lyonnet DS, and Vlovy JL. 2004. A high throughput mutation detection method base on heteroduplex analysis using graft copolymer matrixes: application to Brca1 and Brca2 analysis. Anal. Chem. 76:4839-4848.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG and Pryor RJ. 2003. High-Resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. Clinical Chemistry 49: 6, 853-860.

Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, and Lee SJ. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases., PNAS. 100:2615842–15846

Womack JE. 2005. Advances in livestock genomics: Opening the barn door. Genome Res. 15:1699-1705

Xiao W and Oefner P. 2001. Denaturing high-performance liquid chromatography:a review. Human mutation 17:439-474.

Yan H and Zhou W. 2004. Allelic variations in gene expression. Current Opinion in Oncology. 16:39-43

Zhou H, Hickford JGH, Fang Q. 2005. Technical Note: Determination of alleles of the ovine PRNP gene using PCR-single-strand conformational polymorphism analysis. J.Anim.Sci. 83:745-749

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green 1, its structure determination and methodological implications . Nucleic Acids Research:32:e103 1-10

Zorrilla RJ. 2007. Retos del mundo pecuario de rumiantes a corto y mediano plazo en México. Disponible en el sitio de red: <http://www.vimifos.com/UserFiles/File/ANALISIS%20CADENA%20BOV%5B1%5D.CARNE%20%20FEB-07%20%20VIMIFOS.pdf>. [revisado 03 Jul. 2009].

APENDICE A

MÉTODO PARA EXTRACCIÓN DE ADN

Para el aislamiento del ADN se utilizó 3 mL de sangre y antes de continuar con las instrucciones indicadas en el estuche comercial Wizard (Promega, Madison, WI, USA) se aplicó 2 lavados con 9 mL de solución de lisis I (155ml NH₄Cl, 0.1mM EDTA, 10ml NaHCO₃, pH 7.4). Al final de la extracción el precipitado de ADN se recuperó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y fue secado y disuelto en 250 uL de agua milli-Q (Millipore Corporation, Bedford , MA, USA) estéril.

Procedimiento:

- 1 Colocar 3 mL de sangre completa en un tubo falcon de 15 mL.
- 2 Agregar 9 mL de solución Lisis I.
- 3 Incubar las muestras en hielo durante 15 min, mezclando bien por inversión de manera suave.
- 4 Centrifugar durante 10 min a 2700 rpm.
- 5 Descartar sobrenadante y resuspender la pastilla usando el vortex.
- 6 Repetir paso 2 a 5
- *7 Descartar sobrenadante y resuspender la pastilla de leucocitos en 9 mL de solución Lisis celular, incubar 5 min en hielo y centrifugar como en el paso anterior. Repetir la operación hasta obtener una pastilla limpia (blanca).
- 8 Lisis del núcleo. Agregar 3.0 mL de solución de lisis de núcleo, mezclar por inversión o hasta disolver la pastilla y proseguir con vortex por 20 s.

9 Precipitación de proteínas. Añadir 1 mL de solución de precipitación de proteínas, y proceder al vortex por 20 s. Centrifugar durante 10 min a 2700 rpm.

10 Precipitación de ADN y rehidratación. Transferir el sobrenadante a un tubo conteniendo 3 mL de alcohol isopropílico.

11 Mezclar y centrifugar durante 10 min a 2700 rpm. Descartar el sobrenadante, adicionar 3 mL de alcohol etílico al 70% y centrifugar durante 10 min a 2700 rpm. Aspirar el alcohol etílico y secar la pastilla al aire. Rehidratar la pastilla de ADN con 250 μ L de la solución de rehidratación de ADN o agua milli-Q esteril por una hora a 65 °C ó toda la noche a 4°C.

*a partir de éste paso utilizar los reactivos del estuche Wizard

APENDICE B

MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE ADN

ANÁLISIS UV

La cuantificación se realizó mezclando 10µL del ADN en 490 uL de agua. La concentración y calidad de ADN se obtuvo en el espectrofotómetro DU 650 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton California, USA) con lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm . La concentración de ADN se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Concentración (ng/}\mu\text{L)} = (A_{260\text{nm}})(\text{Factor de dilución})(\text{Factor de conversión})$$

Donde:

$$A_{260\text{nm}} = \text{Absorbancia a } 260\text{nm}$$

$$\text{Factor de dilución} = (\text{Volumen total de dilución}) / (\text{Volumen de la muestra}): 500\text{uL} / 10\text{uL} = 50$$

$$\text{Factor de conversión} = 50 \mu\text{g/mL para un ADN de doble cadena}$$

La calidad de las muestras extraídas se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Calidad} = A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$$

-El rango de calidad aceptable se encuentra entre 1.8-2.0

ANÁLISIS POR FLUORESCENCIA

(REACTIVO HOECHST 33258)

Aparatos

Mini fluorometro TD-360 (Turner Designs, Sunnyvale, CA. USA) con sistema óptico 3600-901: filtro UV largo, pico de longitud de onda 365nm

Reactivos y materiales

Cuvetas metacrilato 10mm x 10mm 7000-959 (Turner Designs, Sunnyvale, CA. USA)

Solución patrón Hoechst 33258 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR. USA)

Solución amortiguadora TNE 10X

Agua milli-Q esteril

Preparación de soluciones

Solución patrón Hoechst 33258 (1mg/mL):

Diluir 1 mL del reactivo Hoechst 33258 (10mg/mL) con 9 mL de agua filtrada, almacenar en bote a 4°C hasta por 6 meses.

Solución patrón amortiguadora TNE 10X

Disolver en 800 mL de agua filtrada:

12.11 g Tris base (PM=121.14)

3.72 g EDTA 2Na.2H₂O (PM=372.20)

116.89 g NaCl (PM=58.44)

Ajustar a pH 7.4 con HCL concentrado.

Aforar a 1000 mL

Filtrar con membrana nylon de poro 0.45µm antes de usar

Almacenar a 4°C hasta por 3 meses

Nota: pH y concentración de NaCl son esenciales para la reacción.

Solución de ensayo de rango bajo (10-500 ng/mL de ADN):

Diluir 10uL de la solución patron Hoechst 33258 (1mg/mL) con 10mL TNE 10X y 90 mL de agua filtrada. Preparar diariamente esta solución.

Solución de ensayo de rango alto (100-5000 ng/mL de ADN) :

Diluir 100uL de la solución patrón Hoechst 33258 (1mg/mL) con 10mL TNE 10X y 90 mL de agua filtrada. Preparar diariamente esta solución.

TNE 1X

Diluir 10 mL TNE 10X con 90 mL de agua milli-Q

Estandar de ADN Calf Thymus 0.25 unidades (12,5 ug/mL)

Diluir con TNE 1X a la concentración deseada, mezclar suavemente

Almacenar a 4°C hasta por 3 meses

5.5.2.4 Procedimiento

Nota: Eliminar las burbujas de aire formadas, golpeando suavemente los lados de la cuveta.

Seleccionar el rango más apropiado para analizar sus muestras. Si el ensayo de rango bajo (10 a 500 ng/mL ADN) es seleccionado, prepare 2 mL de 100 ng/mL ADN adicionando 2 uL de 100ug/mL ADN a 2mL de la solución de rango bajo. Si el ensayo de rango alto (100 a 5000 ng/mL ADN) es seleccionado, prepare 2 mL de 1000 ng/mL ADN adicionando 2 uL de 1000 ug/mL ADN a 2mL de la solución de rango alto.

Seleccione las unidades de medida: presione [MENU] y seleccione las unidades

Utilice la solución diluyente de ADN como blanco (rango bajo o rango alto). Coloque 2 mL en la cuveta, colóquela en el instrumento y cierre la tapa. Presione [BLANK]. Presione [1] para aceptar el valor. Remueva la cuveta.

Calibre el instrumento utilizando el estándar de rango bajo o alto. Inserte la cuveta con el estándar de ADN en el instrumento, cierre la tapa, presione [CAL]. Anote la concentración actual del estándar, presione [ENT]. Remueva la cuveta.

Mida la fluorescencia de las muestras desconocidas, adicionando 2 uL del problema y 2 mL de la solución usada para estándares y blanco. Inserte la cuveta conteniendo 2 mL del problema y cierre la tapa.

5.3.2.2.1 Aparato.

Mini fluorometro TD-360 (Turner Designs, Sunnyvale, CA. USA) con sistema optico 3600-901: filtro long UV, pico de long. onda 365nm

5.3.2.2.2 Reactivos y materiales

Cuvetas metacrilato 10mm x 10mm 7000-959 (Turner Designs, Sunnyvale, CA. USA).

Solución patron Hoechst 33258 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR. USA)

Solución amortiguadora TNE 10X

Agua milli-Q esteril

5.3.2.2.3 Preparación de soluciones

Solución patrón Hoechst 33258 (1mg/ml):

Diluir 1 mL del reactivo Hoechst 33258 (10mg/ml) con 9 mL de agua filtrada, almacenar en frasco oscuro a 4°C hasta por 6 meses.

Solución patrón amortiguadora TNE 10X:

Disolver en 800 ml de agua filtrada:

12.11 g Tris base (PM=121.14) [Tris (hydroxymetil) aminometano]

3.72 g EDTA.2Na.2H₂O (ácido etilen-diamino tetra-acético, sal disodica dihidrato: PM=372.20)

116.89 g NaCl (cloruro de sodio:PM=58.44)

Ajustar a pH 7.4 con HCL concentrado.

Aforar a 1000 mL

Filtrar con membrana nylon de poro 0.45uM antes de usar

Almacenar a 4°C hasta por 3 meses

Nota: pH y concentración de NaCl son esenciales para la reacción.

Solución de ensayo de rango bajo (10-500 ng/ml de DNA):

Diluir 10uL de la solución patrón Hoechst 33258 (1mg/ml) con 10mL TNE 10X y 90 mL de agua filtrada. Preparar diariamente esta solución.

Solución de ensayo de rango alto (100-5000 ng/ml de DNA) :

Diluir 100uL de la solución patrón Hoechst 33258 (1mg/ml) con 10mL TNE 10X y 90 mL de agua filtrada. Preparar diariamente esta solución.

TNE 1X

Diluir 10 mL TNE 10X con 90 mL de agua milli-Q.

Estandar de ADN Calf Thymus 12.5 µg/mL.

Diluir con TNE 1X a la concentración deseada, mezclar suavemente.

Almacenar a 4°C hasta por 3 meses.

5.3.2.2.4 Procedimiento

Nota: Eliminar las burbujas de aire formadas, golpeando suavemente los lados de la cuveta.

Seleccionar el rango más apropiado para analizar sus muestras. Si el ensayo de rango bajo (10 a 500 ng/mL ADN) es seleccionado, prepare 2 mL de 100 ng/mL ADN adicionando 2 μ L de 100ug/mL ADN a 2mL de la solución de rango bajo. Si el ensayo de rango alto (100 a 5000 ng/mL ADN) es seleccionado, prepare 2 mL de 1000 ng/mL ADN adicionando 2 μ L de 1000 μ g/mL ADN a 2mL de la solución de rango alto.

Seleccione las unidades de medida: presione [MENU] y seleccione las unidades.

Utilice la solución diluyente de ADN como blanco (rango bajo o rango alto). Coloque 2 mL en la cuveta, colóquela en el instrumento y cierre la tapa. Presione [BLANK].

Presione [1] para aceptar el valor. Remueva la cuveta.

Calibre el instrumento utilizando el estándar de rango bajo o alto. Inserte la cuveta con el estándar de ADN en el instrumento, cierre la tapa, presione [CAL]. Anote la concentración actual del estándar, presione [ENT]. Remueva la cuveta.

Mida la fluorescencia de las muestras desconocidas, adicionando 2 μ L del problema y 2 mL de la solución usada para estándares y blanco. Inserte la cuveta conteniendo 2 mL del problema y cierre la tapa.

ANÁLISIS POR DENSITOMETRÍA

Aparato

Fotodocumentador EDAS 120 (Eastman Kodak Company. Rochester, N.Y. USA), con el programa computacional *ID Image Analysis* del mismo proveedor.

-Se preparó un gel de agarosa al 1.5 % y depositó en cada pozo del gel, 5 uL del pPCR mezclados con 2 uL de una mezcla 1:1 de SYBR-Gold 100X (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR. USA): azul de bromotimol-xilen-cianol (Promega, Madison, WI, USA). La electroforesis se realizó en una cámara Wide (Bio-Rad Laboratorios, Inc. Hercules Ca. USA), en amortiguador TBE 1X, aplicando un voltaje de 10 V/cm, durante 1 h.

-En los tres primeros carriles se depositó un marcador de masa (Lambda 0.578µg/µL) en concentración de 50, 100 y 250 ng respectivamente.

-Una vez obtenidos los patrones electroforéticos, se calculó la concentración de ADN de cada una de las muestras utilizando el programa computacional Kodak-*ID Image Analysis*.

APENDICE C

TABLA C1

CUANTIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE 3 MÉTODOS EN GANADO CHIANINA

No.	^a Hoechst	ng/ul		Calidad
		^b Densitometría	^c A _{260nm}	A _{260nm} /A _{280nm}
1	-	421	24	1.8
2	229	473	240	1.7
3	950	310	1314	1.6
4	-	280	1293	1.6
5	186	370	205	1.6
6	188	302	218	1.6
7	232	180	230	1.6
8	200	455	193	1.7
9	244	315	292	1.4
10	382	402	395	1.6
11	252	152	319	1.4
12	688	236	820	1.5
13	224	472	214	1.7
14	160	395	458	1.6
15	438	411	682	1.6
16	21	371	48	2.4

a=fluorescencia

b=densitometría

c=espectrofotometría, dilución 1:200

TABLA C2

CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN EN GANADO LIMOUSIN

MUESTRA	^a A _{260 nm}	^b A _{280 nm}	Calidad A _{260nm} /A _{280nm}	^c Conc. ng/μL
L585	0.0448	0.0317	1.4	224.0
L479	0.0306	0.0215	1.4	153.0
L581	0.0525	0.035	1.5	262.5
L562	0.0945	0.0601	1.6	472.5
L554	0.053	0.0356	1.5	265.0
L539	0.0269	0.0186	1.4	134.5
L526	0.0199	0.0117	1.7	99.5
L515	0.0575	0.0356	1.6	287.5
L599	0.0485	0.0292	1.7	242.5
L991	0.0642	0.0479	1.3	321.0
L542	0.0087	0.005	1.7	43.5
L579	0.0253	0.017	1.5	126.5
L570	0.1012	0.0619	1.6	506.0
L572	0.0358	0.0207	1.7	179.0
L517	0.0884	0.0579	1.5	442.0
L475	0.0531	0.0338	1.6	265.5
L566	0.0681	0.0571	1.2	340.5
L594	0.0296	0.0195	1.5	148.0
L519	0.0275	0.0175	1.6	137.5
L522	0.0349	0.022	1.6	174.5
L592	0.0644	0.0402	1.6	322.0
L497	0.0016	0.0006	2.7	8.0
L546	0.0324	0.0187	1.7	162.0
L574	0.0007	0.0014	0.5	3.5
L2095	0.1579	0.1185	1.3	789.5
L532	0.0039	0.0037	1.1	19.5
L574	-0.00131	0.0011	-1.2	-6.6

a=absorbancia a 260 nm

b=absorbancia a 280 nm

c=concentración de ADN, dilución 1:100

TABLA C3

CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN EN GANADO BRAHMAN

MUESTRA	^a A _{260 nm}	^b A _{280 nm}	Calidad A _{260nm} /A _{280nm}	^c Conc. ng/μL
B1	0.0093	0.0057	1.63	93
B2	0.0268	0.0161	1.66	268
B3	0.0037	0.0017	2.18	37
B4	-0.0017	-0.0017	1.00	-17
B5	-0.0003	-0.0005	0.60	-3
B6	0.0015	0.0004	3.75	15
B7	-0.0018	-0.0018	1.00	-18
B8	-0.0011	-0.0009	1.22	-11
B9	0.0106	0.0058	1.83	106
B10	0.0142	0.0091	1.56	142
B11	-0.0024	-0.0023	1.04	-24
B12	0.0076	0.0041	1.85	76
B13	0.0069	0.0069	1.00	69
B14	0.0141	0.0083	1.70	141

a=absorbancia a 260 nm

b=absorbancia a 280 nm

c=concentración de ADN, dilución 1: 200

TABLA C4

CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL ADN EN GANADO SIMMENTAL

MUESTRA	^a A _{260 nm}	^b A _{280 nm}	Calidad A _{260nm} /A _{280nm}	^c Conc. ng/μL
02-04	0.024	0.015	1.60	240
0-47	0.034	0.0217	1.57	340
7-73	0.012	0.0073	1.64	120
2-42	0.0146	0.009	1.62	146
03-07	0.037	0.025	1.48	370
0-14	0.0218	0.0132	1.65	218
04-10	0.0477	0.033	1.45	477
0-11	0.0164	0.0114	1.44	164
02-57	0.0229	0.0143	1.60	229
2-01	0.0352	0.0221	1.59	352
04-201	0.0073	0.0047	1.55	73
7-15	0.0084	0.0049	1.71	84
04-16	0.0289	0.0185	1.56	289
4-21	0.019	0.0114	1.67	190
2-07	0.0117	0.0071	1.65	117
2-56	0.0018	0.0007	2.57	18
0-51	0.0385	0.025	1.54	385
02-32	0.0176	0.0107	1.64	176
43-54	0.0037	0.0031	1.19	37
9-18	0.0143	0.0081	1.77	143
2-09	0.0377	0.024	1.57	377
4-14	0.0351	0.023	1.53	351
5-11	0.0279	0.0168	1.66	279
0-15	0.0055	0.0024	2.29	55
1-34	0.0275	0.0175	1.57	275
01-20	0.0225	0.0137	1.64	225
61-86	0.0629	0.0413	1.52	629
2-55	0.0186	0.011	1.69	186
04-02	0.0222	0.0131	1.69	222
04-18	0.03	0.02	1.50	300
2-96	0.0271	0.0174	1.56	271
3-33	0.0404	0.0248	1.63	404
04-01	0.0099	0.0052	1.90	99
2-25	0.0277	0.016	1.73	277

2-41	0.0319	0.02	1.60	319
2-61	0.0149	0.0093	1.60	149
9-10	0.0149	0.009	1.66	149
2-63	0.0347	0.0215	1.61	347
06-04	-0.0011	-0.0016	0.69	-11
06-04	0.0001	-0.0003	-0.33	1
4-11	0.0055	0.0028	1.96	55
7-30	0.0325	0.0205	1.59	325
03-31	0.0176	0.0106	1.66	176
0-43	0.0047	0.0033	1.42	47
02-60	0.0373	0.0231	1.61	373
04-02	0.0306	0.0203	1.51	306
01-24	0.0166	0.0101	1.64	166
2-17	0.0093	0.0051	1.82	93
7-31	-0.0013	-0.0017	0.76	-13
04-14	0.0017	-0.0005	-3.40	17
02-43	0.0039	0.0019	2.05	39
02-38	0.0279	0.0175	1.59	279
02-54	0.0053	0.0028	1.89	53
04-22	0.0218	0.0132	1.65	218
04-13	0.0205	0.0122	1.68	205
05-03	0.0441	0.0298	1.48	441
04-56	0.0408	0.0268	1.52	408
05-02	0.0346	0.0221	1.57	346
3-21	0.0275	0.017	1.62	275
1-15	0.0178	0.0111	1.60	178
04-19	0.0055	0.0029	1.90	55
1-22	0.0489	0.0326	1.50	489
2-40	0.0209	0.013	1.61	209
2-26	0.0205	0.013	1.58	205
04-02	0.0004	0.0001	4.00	4

a=absorbancia a 260 nm

b=absorbancia a 280 nm

c=concentración de ADN, dilución 1:200

APENDICE D

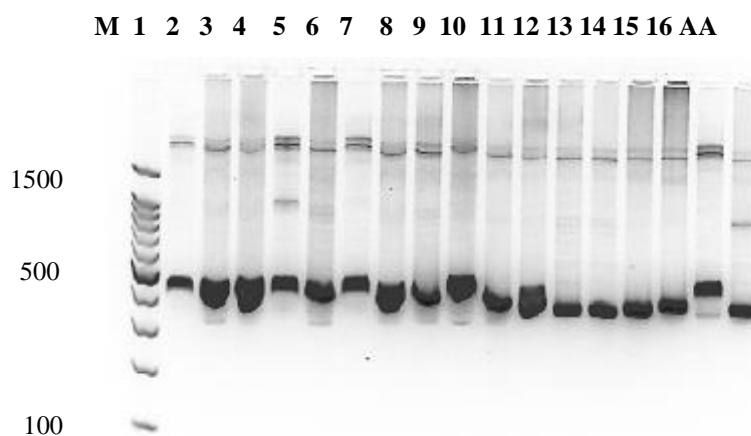
Análisis de Tm's

Muestras de referencia		Ganado Chianina	
Ganado Beefmaster			
Muestra	Tm °C	Muestra	Tm °C
13871PAA	72.4	D5	70.4
14171PAA	72.5	D6	70.4
13971PAA	72.0	D8	70.4
14271PAA	72.4	D3	70.8
14071PAA	72.1	D11	70.8
15361PAB	72.0	D12	70.8
15661PAB	72.0	D14	71
15461PAB	71.8	D13	71.2
15761PAB	72.0	D2	71.2
15561PAB	71.8	D4	71.2
15879PAC	71.9	D15	71.2
16179PAC	71.6		
15979PAC	71.8		
16279PAC	71.8		
16079PAC	71.5		
14325F1BB	72.1		
14625F1BB	72.1		
14425F1BB	72.0		
14725F1BB	72.0		
14525F1BB	71.7		
14863PCC	71.9		
15163PCC	71.9		
14963PCC	71.6		
15263PCC	71.6		
15063PCC	71.5		

APENDICE E

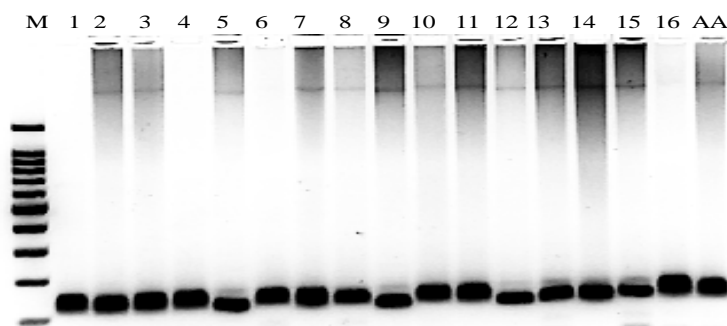
AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS 1, 2 y 3 DE ADN DEL GEN DE LA MSTN

FRAGMENTO 1

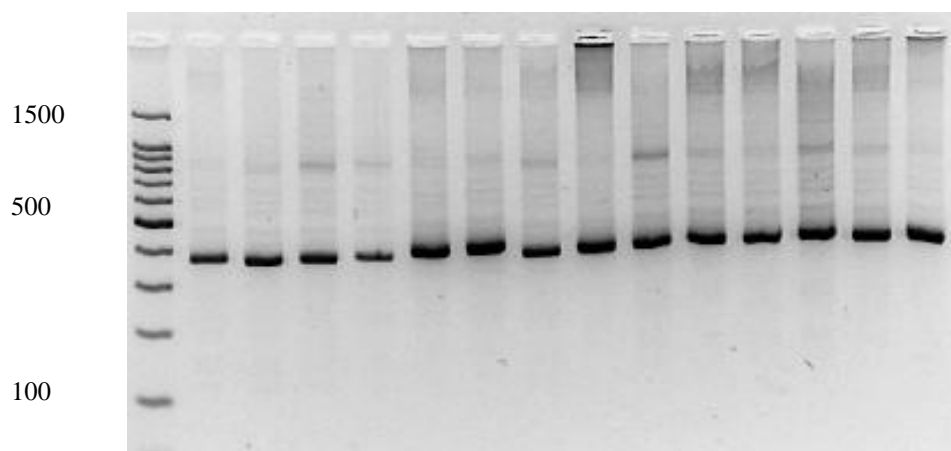


Amplificación del fragmento de ADN, región I, 419 pb. Gel de agarosa 1.5%. M=marcador 100 pb. AA=haplotipo normal en ganado Beefmaster. 1 a 16: muestras de ganado raza Chianina.

FRAGMENTO 2



Amplificación del fragmento de ADN, región II, 112 pb. Gel de agarosa 1.5%. M=marcador 100 pb. AA=haplotipo normal en ganado Beefmaster. 1 a 16: muestras de ganado raza Chianina.

FRAGMENTO 3

Amplificación del fragmento de ADN, región III, 378 pb. Gel de agarosa 1.5%.

M=marcador 100 pb. AA=haplotipo normal en ganado Beefmaster. 1 a 16: muestras de ganado raza Chianina

RESUMEN BIOGRÁFICO

Víctor Ricardo Moreno Medina

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Título de la Tesis: VARIACIONES NUCLEOTÍDICAS DEL GEN DE *MIOSTATINA* EN GANADO BOVINO DE CARNE

Campo de Estudio: Biotecnología Genómica

Datos Personales: Nació en Hidalgo del Parral Chihuahua el 23 de Diciembre de 1957, hijo de Ciro Moreno Moreno y Eustolia Medina Silva, curso la carrera Profesional de QBP en la Universidad Autónoma de Nuevo León , de 1974 a 1978, la Maestría en Ciencias en Química Analítica Aplicada en la Universidad Regiomontana, de 1980 a 1985, trabajó en la UANL como maestro de tiempo completo y fue director de varias tesis de licenciatura, realizó actividades de Control de Calidad y Aseguramiento de Calidad. en las empresas Enzymologa S.A. de C.V. y Grupo Bioquímico Mexicano. Actualmente es Profesor Asociado en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional.

Evaluación de regiones polimórficas del gen de la miostatina en ganado Beefmaster

Evaluation of polymorphic regions of myostatin gene in Beefmaster cattle breed

VR Moreno^{b*}, AM Sifuentes^a, XF De La Rosa^a, B Pereyra^b

^aLaboratorio de Biotecnología Animal I, Centro de Biotecnología Genómica del I.P.N. Reynosa Tamaulipas, México.

^bLaboratorio 4 del Instituto de Biotecnología, F.C.B., U.A.N.L., Monterrey N.L., México.

SUMMARY

Here we analyze GDF8 gene regions which are potential carriers of polymorphisms using both base excision sequence scanning thymine-base (BESS-T) and a fluorescent technique based on temperatures of dissociation (Tm's) technique. The first one permitted us to detect five nucleotide changes located four in the flanking regions of introns 1 and 2 and one in exon II. All the sequence variations were grouped in 11 haplotypes, which were distributed in the population tested. In order to evaluate a highest number of animals, a Tm's technique was optimized to analyze the region harboring most of mutations previously detected with BESS-T. Validation of Tm's technique was achieved comparing both the BESS-T and Tm's technique results. We found a 93.5% of correlation between these techniques.

The GDF8 gene mutations found in Beefmaster, do not suggest any effect on gene expression, however, their high frequency in the studied population makes interesting further studies focused to evaluate their association with productive traits such as weight gain or body conformation. The Tm's technique is proposed as a moderate throughput method which could be used for detection of mutated genotypes.

Palabras clave: miostatina, GDF8, SYBR Green I, bovino.

Key words: myostatin, GDF8, SYBR Green I, bovine.

INTRODUCCION

La mayoría de los genes asociados a una característica fenotípica o cuantitativa presentan variantes alélicas con mutaciones que son específicas de poblaciones e incluso de familias; un ejemplo, es el gen miostatina (GDF8), el cual se expresa primordialmente en el músculo en desarrollo y tejido esquelético adulto (McPherron y col 1977). Funcionalmente, la miostatina actúa como un regulador extracelular negativo y es clave en el crecimiento y desarrollo muscular produciendo según el grado de inhibición de la proteína, hipertrofia e hiperplasia celular (incremento en tamaño de fibras musculares y en el número de fibras musculares, respectivamente) (Masumi y col 2002). Se han identificado mutaciones raza-específicas, que son causa de la doble musculatura, principalmente cuando se presentan en cualquiera de los tres exones que constituyen el gen (Kambadur y col 1997). Las diferentes formas alélicas de GDF8 también se asocian con la eficiencia productiva y calidad de la carne del ganado bovino (Pozzi y col 2004), razón por la cual, GDF8 es uno de los genes más importantes a

caracterizar en las diferentes razas para establecer su potencial uso como marcador de selección (De La Rosa 2003). Determinar en un gran número de muestras la presencia de mutaciones en nucleótidos facilitará el análisis genético de ligamiento y los estudios de asociación con enfermedades específicas (Kojo y col 2001). Actualmente, se han descrito metodologías que permiten la detección de mutaciones y polimorfismos sin la necesidad de recurrir a la secuenciación, de ellas destaca el uso de técnicas de detección basadas en fluorescencia, ya que ofrecen ventajas como son la rapidez y bajo costo de la prueba (Rudi y col 2005).

El análisis de las temperaturas de disociación (Tm's) se utiliza para la detección de mutaciones y tiene como principales aplicaciones el genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) y detección de productos no deseados en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) (Zipper y col 2004).

En México la ganadería bovina basa sus intereses principalmente en la producción de leche, pie de cría y carne. El objetivo de este estudio fue analizar en ganado bovino de la raza Beefmaster, regiones polimórficas del gen GDF8 mediante la técnica de escaneo de secuencias por escisión de la base timina y evaluar un procedimiento de moderado rendimiento basado en el análisis de Tm's, para determinar la frecuencia de variación nucleotídica y capacidad de seleccionar individuos con un genotipo con ventajas productivas.

Aceptado: 12.07.2007.

* Col. Universitaria, Ave. Pedro de Alba y Manuel L. Barragan S/N, c.p. 66450, San Nicolás de los Garza N.L., México; vmorenom@ipn.mx

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLOGICO

Fue empleado ganado de registro de la raza Beefmaster proveniente de un rancho ubicado en el Noreste del estado de Tamaulipas, México. El análisis de escaneo de secuencias por escisión de la base timina (BESS-T) se realizó a partir de muestras de sangre de 96 machos, mientras que la medición de Tm's se realizó con 104 individuos incluyendo 61 machos de los previamente evaluados con la técnica de BESS-T. Se colectaron de 2 a 3 mL de sangre en tubos con EDTA. El ADN genómico fue extraído mediante la técnica de precipitación salina (Sambrook y col 1989).

ANALISIS DE BESS-T

Para la búsqueda de mutaciones en gen GDF8 de la raza Beefmaster se empleo la técnica BESS-T. Esta técnica ha sido reportada para detectar SNP's en genes de mamíferos (Hawkins y Hoffman 1997) y consiste en la incorporación de 2' deoxiuridina 5-trifosfato (dUTP) en los productos obtenidos mediante PCR, para posteriormente digerir el producto con las enzimas: Uracilo N-glicosilasa y Endonucleasa IV (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). Los iniciadores usados en la amplificación están dirigidos hacia dos regiones de GDF8: exón II y exón III. En ambas regiones los iniciadores abarcan parte del intrón que flanquea a cada uno de los exones. La secuencia de los iniciadores son: MIOIIF 5'-GATTGATATGGAGGTGTTTCG-3' y MIOIIR 5'-ATAAGCACAGGAACTGGTA-3'; para la región del exón 2 y MIOIIIF 5'-TGACATAAGCAAATGATTA-3' y MIOIIIR 5'-ATACTCTAGGCCTATAGCCTGTGGT-3'; para la región del exón III (Karim y col 2000). El tamaño de los productos es de 548 y 578 pb, respectivamente. Para la visualización de los productos de la reacción de escisión, los iniciadores fueron marcados con fluorescencia IRD-800 en el extremo 5' y analizados en geles de poliacrilamida al 6,5%, en el secuenciador Li-COR IR² (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA). La comparación de los patrones de bandas obtenidos en relación con una muestra de referencia (Genbank: AB076403.1.) permitió la identificación de mutaciones que implican timina. Los patrones de bandas visualizados fueron traducidos en forma binaria como "0" ausencia y "1" presencia de banda, con el cual se construyó un haplotipo para cada muestra. El número y frecuencia de alelos y haplotipos se estimaron en el programa HaploMAu (González-Paz 2002). Para la verificación de los cambios nucleotídicos detectados se realizó secuenciación en 18 muestras, con el estuche SequiTherm EXCELTM II DNA Sequencing (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) y el secuenciador (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA).

ANALISIS DE MEDICION DE Tm'S

Para determinar la frecuencia de variación nucleotídica y capacidad de seleccionar individuos con genotipo

mutado se diseñó un par de iniciadores que abarcan la región nt 2293 – nt 2404 (exón II) de la secuencia del gen de la miostatina (Genbank: AF_320998.1). A partir del ADN genómico, se amplificó una región de 112 pb con los iniciadores sentido 5'GATTGATATGGAGGTGTTTCG-3' y antisentido 5'CAACATTTGGGTTTTCCTTC-3'. La PCR se realizó en un volumen total de 17,5 µL, utilizando 12,5 µL de mezcla SYBR Green 2X (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 5 pmoles de cada iniciador y 150 ng de ADN. La PCR se realizó en un termociclador PTC200 (MJ Research, Waltham, Mass. USA), bajo el siguiente programa de temperaturas: un paso de activación enzimática a 95 °C por 10 min, seguido por 30 ciclos de [94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min], y un paso final de 72 °C por 5 min.

Protocolo de disociación. Los productos de PCR se transfirieron a una microplaca de 96 pozos (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) donde se realizó la disociación térmica del colorante SYBR Green I intercalado en la doble cadena de ADN. Para ello se utilizó el Termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) con un gradiente de temperatura de 60 °C a 90 °C. Las gráficas y temperaturas de disociación (Tm's) correspondientes para los diferentes individuos se generaron utilizando el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Análisis estadístico y exactitud de la medición de Tm's. Se utilizaron las temperaturas de disociación (Tm's) para formar el grupo con genotipo mutado indicado por el rango de temperatura menor y el grupo con genotipo normal, indicado por el rango de temperatura mayor. Mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Guzmán y Tirado 1993) se evaluó estadísticamente la capacidad del ensayo de disociación utilizando el programa SPSS versión 10.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago Illinois, USA) para distinguir individuos portadores de cambios nucleotídicos en el fragmento de miostatina. La exactitud de la medición de Tm's se verificó comparando los resultados obtenidos en el análisis de 61 muestras con la técnica de BESS-T, previamente utilizada para la búsqueda de mutaciones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Detección de mutaciones. El análisis de dos regiones de GDF8 utilizando la técnica de BESS-T permitió establecer los individuos con genotipo normal, mutado o heterocigoto. Se encontraron cinco cambios, los cuales se corroboraron por secuenciación: en el intrón I se encontraron dos transiciones y una delección, en el exón II se detectó una transición y en el intrón II una delección. Las mutaciones encontradas son del tipo silencioso y reportado en ganado de razas europeas por Grobet y col (1998) y Dunner y col (2003). Las mutaciones en la raza Beefmaster, han sido descritas en las razas Hereford y Shorthorn, dos de las

razas que conforman al Beefmaster. En la raza Hereford las mutaciones nt 414, nt 374-51, nt 374-50, nt 374-16 y nt 748-78 se agruparon para formar el haplotipo 4, mientras que en la Shorthorn, la mutación nt 374-51 se denominó haplotipo 3, el cual fue propuesto por los autores como alelo silvestre de miostatina por presentarse en 24 de las 28 razas estudiadas (Dunner y col 2003). La localización y denominación de las mutaciones se presentan en el cuadro 1 y estos resultados se suman al cada vez mayor número de razas de ganado bovino en las cuales se ha estudiado GDF8 y se ha demostrado su alta variabilidad genética (Miranda y col 2001).

Cuadro 1. Formas alélicas para el gen GDF8 en la raza Beefmaster.

Allelic forms of GDF8 gene in Beefmaster cattle breed.

Alelos identificados en la raza Beefmaster		Frecuencia
AA	Normal o silvestre	0,3385
AB	nt 374-16 (del T)	0,1458
AC	nt 374-16 (del T), nt 374-51 (T > C), nt 374-50 (G > A) y nt 414 (C > T)	0,0469
AD	nt 748-78 (del T)	0,2760
BD	nt 374-16 (del T), nt 748-78 (del T)	0,0573
CD	nt 374-16 (del T), nt 374-51 (T > C), nt 374-50 (G > A), nt 414 (C > T) y nt 748-78 (del T)	0,1354

Secuencia de referencia: Genbank: AB076403.1.

nt = nucleótido, del = delección; nt 374-16 (del T) se refiere al nucleótido timina localizado 16 bases río arriba del exón II; nt 748-78 (del T) se refiere al nucleótido timina localizado 78 bases río arriba del exón III, es decir dentro del intrón II.

Cuadro 2. Frecuencia de los haplotipos de GDF8 en la raza Beefmaster.

Haplotype frequencies of GDF8 in Beefmaster cattle breed.

	Haplotype		Frecuencia	
	Alelo 1	Alelo 2	No. Ind.	%
1	AA	AA	25	26,04
2	AA	AD	10	10,42
3	AD	AD	3	3,13
4	AB	AA	5	5,21
5	AB	AD	23	23,96
6	AD	BD	5	5,21
7	AC	AD	8	8,33
8	BD	BD	3	3,13
9	CD	CD	12	12,50
10	AD	CD	1	1,04
11	AC	CD	1	1,04
			96	100%

Alelos y haplotipos de GDF8. Previamente, se describió como alelo silvestre a una variante de miostatina carente de mutaciones y presente en la raza Holstein (Grobet y col 1998). En Beefmaster, la variante AA se presentó con mayor frecuencia que las otras variantes. Este resultado puede deberse al porcentaje de sangre Brahman en la hibridosis de la Beefmaster (25% Shorthorn, 25% Hereford y 50% Brahman). El alelo AD (delección nt 748-78) fue el segundo más frecuente en la raza Beefmaster y se ha identificado en la raza Hereford dentro del grupo de mutaciones del haplotipo 4 (Dunner y col 2003). En las muestras analizadas se identificaron 6 alelos (cuadro 1). Utilizando la secuencia AB076403.1. depositada en el GenBank como referencia, el alelo más frecuente fue el normal caracterizado por la ausencia de cambios nucleotídicos (AA=0,3385). El segundo alelo con mayor frecuencia presentó la delección nt748-78 (AD = 0,2760). Con las formas alélicas se establecieron 11 haplotipos. El haplotipo normal homocigoto (AA/AA) representó al 26,04% de los animales estudiados y el haplotipo AB/AD, heterocigoto para las dos delecciones identificadas en el análisis, estuvo representado por el 23,96% de los animales (cuadro 2). Los haplotipos AA/AA y AB/AD estuvieron representados con las frecuencias más altas y los haplotipos AD/CD y AC/CD con las frecuencias menores.

Análisis de medición de Tm's. Se seleccionó la región del exón II para evaluar la técnica de medición de temperatura de disociación (Tm's), como un método rápido para la detección de variaciones nucleotídicas. En 104 muestras, incluyendo las previamente evaluadas por BESS-T, se midió la Tm's, la cual se define como la derivada de la variación máxima en fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT). En la figura 1 se presentan de forma gráfica la dispersión de los valores de la Tm's y se observa para el grupo de individuos con genotipo normal un rango de Tm's mayor que para el grupo de individuos con genotipo mutado.

La prueba no paramétrica de Mann-Whitney permitió establecer una diferencia estadísticamente significativa entre las temperaturas de disociación (Tm's) del grupo de individuos con genotipo normal y el grupo de individuos con genotipo mutado (cuadro 3), verificando la técnica para ser

Cuadro 3. Prueba estadística no paramétrica de Mann Whitney aplicada a los valores de las mediciones de Tm's.

Non - parametric Mann Whitney statistical test used in the measure of Tm's.

Grupo	N	Rango (medias)	Rango (suma)
1	74	37,5	2775
2	30	89,5	2685
Total	104		

Estadístico: Mann-Whitney U = 0,0.

Nivel de significancia : P < 0,05.

Cuadro 4. Comparación entre la técnica de medición Tm's y BESS-T en la región nt2293 a nt2404 de la secuencia del gen de la GDF8 (Genbank: AF_320998.1).

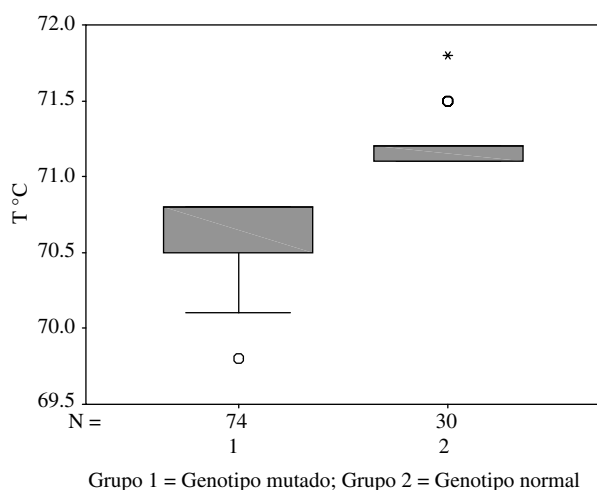
Comparison between the technique of measure Tm's and BESS-T in the region nt2293-nt2404 of the sequence of GDF8 gene (Genbank: AF_320998.1).

Método Tm's		Método BESS-T		Comparación		
^a No	^b Cambio	^a No	^b Cambio	^c Tm's & BESS-T	Discrepancias	Concordancia (%)
104	74	61	31	29	2	93,5%

^a No = Número de muestras analizadas.

^b Cambio = Número de muestras con algún cambio en la secuencia.

^c Tm's & BESS-T= Número de muestras que presentaron por ambos métodos algún cambio en la secuencia.

**Figura 1.** Gráfica de caja donde se observa la distribución de las temperaturas de disociación para los grupos con genotipo mutado (69,8 °C -70,8 °C) y normal (71,1 °C -71,8 °C).

The Box graphic shows the distribution of dissociation temperatures for the groups with mutated genotype (69.8 °C -70.8 °C) and normal genotype (71.1 °C-71.8 °C).

utilizada en la discriminación de genotipos. La comparación de estos resultados con los obtenidos utilizando el método de BESS-T en 61 individuos, permitió determinar una concordancia del 93,5% entre ambos métodos (cuadro 4). La frecuencia de variación del grupo con alelo mutado fue del 71,1% respecto al total de muestras analizadas.

La medición de temperaturas de disociación del gen de miostatina permitió distinguir entre los genotipos normal y mutado sin la necesidad de realizar cambios en el diseño de la PCR, tales como adición de nucleótidos GC en la secuencia de los iniciadores, adición de sustancias químicas como la urea o formamida que afectan la termodinámica de la amplificación (Maruyama y col 2003) o bien el uso de otro compuesto fluorescente como el LCGreen (Wittwer y col 2003). El uso de la Tm's como método de discriminación de variaciones nucleotídicas enfrenta la desventaja de requerir un sistema sensible de detección para medir el cambio de fluorescencia durante el

proceso de disociación (Ahsen y col 2001), sin embargo, es recomendado para llevar a cabo la determinación de frecuencias de genotipos conocidos. El método BESS-T requiere optimizar la amplificación y el proceso de escisión enzimático del fragmento de ADN, aumentando la probabilidad de fallo durante la lectura electroforética, lo cual puede ser una de las causas de las diferencias en la frecuencia encontrada por ambos métodos.

La determinación de la temperatura de disociación (Tm's) de fragmentos de ADN es un método que hace factible el tamizar una población para detectar los individuos con genotipo mutado; adicionalmente, esta metodología puede ser aplicable para el análisis de genes que presentan variantes alélicas conocidas que requieran ser monitoreadas en un gran número de muestras en menor tiempo y menor costo que el requerido por otras metodologías que tienen como base la PCR.

Se ha demostrado que aunque algunas mutaciones de GDF8 causan la disfunción de la proteína, la expresión de la hipertrofia o hiperplasia muscular no puede ser explicada por sólo una mutación disruptiva en un gen. Existe evidencia que el efecto de miostatina es aditivo, es decir, los productos génicos del locus actúan presumiblemente vía autócrina o parácrina para controlar la miogénesis y se asocia con características como peso de la canal, marmoleo, área del músculo longissimus, porcentaje de cortes primarios, entre otros. A este gen se le considera como un QTL asociado con otras regiones génicas con las cuales interacciona para llevar a cabo su función (Stone y col 1999, Casas y col 2000). La influencia de éste en la buena conformación muscular de muchas razas bovinas europeas de carne, además de la alta variabilidad de registros fenotípicos confirma la teoría de loci heterogéneos. En este sentido nuestros resultados muestran que en la raza Beefmaster existen variantes alélicas caracterizadas por mutaciones que teóricamente no causan disfunción del gen; sin embargo, la frecuencia con la que fueron encontrados alelos con mutaciones en una raza destinada a la producción de carne abre la posibilidad de diseñar estudios enfocados a determinar la asociación de los polimorfismos encontrados, con rasgos productivos de la raza Beefmaster.

RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron regiones potencialmente portadoras de mutaciones del gen miostatina, en la raza Beefmaster con la técnica de escaneo de secuencias por escisión de la base timina (BESS-T) y un método fluorescente basado en las temperaturas de disociación (Tm's). Se encontraron cinco cambios nucleotídicos, cuatro en las regiones flanqueantes de los intrones 1 y 2, y uno en el exón II, éstos se agruparon en 11 haplotipos. Se optimizó un método fluorescente basado en la Tm's, para analizar una mayor cantidad de animales en la región con mayor número de mutaciones previamente detectada por BESS-T. La validación de la técnica de Tm's fue realizada utilizando los resultados de las muestras genotipificadas previamente mediante la técnica de BESS-T y se encontró un 93,5% de concordancia entre ambas técnicas. Las mutaciones encontradas mediante la técnica de BESS-T no sugieren un efecto directo sobre la función del gen, sin embargo, su alta frecuencia en la población bajo estudio abre la posibilidad de evaluar su asociación con características productivas, como ganancia de peso o conformación de los individuos portadores. Se propone a la técnica de medición de temperaturas de disociación (Tm's) como un método de tamizaje de moderado rendimiento, para la detección de genotipos mutados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero SEP-CONACYT 39841-Z, CGPI-IPN 20040431, beca CONACYT 33739.

REFERENCIAS

- Ahsen VN, M Oellerich, E Schutz. 2001. Limitations of genotyping based amplicon melting temperature. *Clin Chem* 47, 1331-1332.
- Casas E, S Shackelford, J Keele, R Stone, S Kappes, M Koohmaraie. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of *myostatin*. *Jl Anim Sci* 78, 560-569.
- De la Rosa RXF. 2003. Evaluación de regiones asociadas a ganancia de peso en el genoma de individuos de la raza Beefmaster. *Tesis de maestría*, Centro de Biotecnología Genómica del IPN Reynosa Tamaulipas, México.
- Dunner S, ME Miranda, Y Amigues, J Cañon, M Georges, R Hanset, J Williams, F Ménissier. 2003. Haplotype diversity of the *myostatin* gene among beef cattle breeds. *Genet Sel Evol* 35, 103-118.
- González-Paz M. 2002. HAPLOMAU (programa de cómputo). Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Reynosa, (Tamaulipas) México. [en línea] . URL: http://isis.cbg.ipn.mx/online_tools/.
- Grobet L, D Poncet, LJ Royo, B Brouwers, D Pirottin, C Michaux, F Ménissier, M Zanotti, S Dunner, M Georges. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the *myostatin* function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome* 9, 210-213.
- Guzmán Ramírez ME, Q Tirado López. 1993. *Métodos estadísticos no paramétricos*. 1ª ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México, Pp 97-106.
- Hawkins G, L Hoffman. 1977. Base excision sequence scanning: a new method for rapid sequence scanning and mutation detection. *Nat Biotechnol* 15, 803-804.
- Kambadur R, M Sharma, TPL Smith, JJ Bass. 1997. Mutations in *myostatin* (GDF8) in double muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 7, 910-916.
- Karim L, W Coppieters, L Grobet, A Valentini, M Georges. 2000. Convenient genotyping of six *myostatin* mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim Genet* 31, 396-399.
- Kojo S, EJ Jhonson, DS Bohling. 2001. Solution-based scanning for single base alterations using a double stranded DNA binding dye and fluorescence melting profiles. *Am J Pathol* 3, 845-853.
- Maruyama T, T Takata, H Ichinose. 2003. Simple detection of point mutations in DNA oligonucleotides using SYBR Green. *Biotechnol Lett* 25, 1637-41.
- Masumi N, Y Akihiro, N Shinichirou, N Tsutomu, Y Takashi, I Mitsuo, M Keiji, O Hideyo, N Sumihare. 2002. A missense mutant *myostatin* causes hyperplasic without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 247-251.
- McPherron AC, SJ Lee. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the *myostatin* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12457-12461.
- Miranda M, J Cañon, F Ménissier, R Hanset, J Williams, S Dunner. 2001. Identificación de los distintos haplotipos del gen de la miostatina en razas bovinas europeas. XXXIII-IX Jornadas sobre Producción Animal, ITEA 22,39-41, España.
- Pozzi A, A Galli, G Bongioni. 2004. Real time TaqMan PCR technique: a valid tool for the meat quality certification. XXXIX Simposio Internazionale di Zootecnia Meat Science & Research.
- Rudi K, B Skanseng, SM Dromtorp. 2005. Explorative screening of complex microbial communities by real time 16S rDNA restriction fragment melting curve analyses. *Biotechniques* 39, 116-121.
- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, NY, USA, Pp 17-20.
- Stone R, J Keele J, S Shackelford, S Kappes, M Koohmaraie. 1999. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. *J Anim Sci* 77, 1379-1384.
- Wittwer CT, GH Reed, CN Gundry, JG Vandersteen, RJ Pryor. 2003. High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 6, 853-860.
- Zipper H, H Brunner, J Bernhagen, F Vitzthum. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucl Acids Res* 32, e103.

Herramientas para el análisis de la variación genético-molecular

- ☐ Víctor Ricardo Moreno Medina
- ☐ Ana María Sifuentes Rincón
- ☐ Benito Pereyra Alférez

La replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es un proceso biológico eficiente gracias a la capacidad de las ADN polimerasas y a los sistemas de corrección celulares para mantener la integridad de la molécula del ADN. Sin embargo, el ADN es susceptible a cambios que pueden modificar la secuencia de los nucleótidos de cualquier región del ADN y causar la variación genética entre especies y organismos. Estos cambios pueden ser, principalmente, sustituciones, deleciones e inserciones y producir variantes genéticas que provocan las modificaciones estructurales en proteínas, lo que predispone, en el caso del humano, a cerca de 1000 enfermedades y a diferentes fenotipos o características morfológicas en plantas y animales. La variación genética se produce continuamente a causa de las mutaciones cromosómicas y génicas, las cuales se propagan en los organismos de reproducción sexual mediante el proceso de recombinación.

La información genética de los organismos eucariotes se encuentra en el ADN empacada eficientemente en los cromosomas, y los cambios cromosómicos (mayores de 1Mbp) pueden ser detectados mediante técnicas citogenéticas que actualmente emplean fluorescencia, como la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Variaciones más sutiles a nivel de secuencia de nucleótidos pueden analizarse

Tabla I. Mutaciones posibles a nivel de ADN en pares de bases (pb).

Escala	Mutación
< 0.1 pb	Metilación
1 pb	Transiciones, transversiones
1-10 pb	Deleciones, inserciones
10-10 ² pb	Deleciones, inserciones, inversiones, duplicaciones
10 ² -10 ³ pb	Exón (es), intrón(es), completos
10 ³ -10 ⁵ pb	Genes completos
10 ⁵ -10 ⁷ pb	Conjunto de genes
10 ⁷ -10 ⁹ pb	Segmentos de cromosomas o cromosomas completos

mediante técnicas que han mejorado con los avances de la tecnología, y que permiten detectar y medir la variación, como en el caso de los polimorfismos de nucleótidos de una sola base (SNP's). Aunque no hay una técnica ideal, pues su aplicación y uso dependen de factores como la disponibilidad de equipo, costo de implementación, aplicación a gran escala, sensibilidad, resolución, reproducibilidad y, principalmente, del problema biológico a resolver.

La presente revisión describe de manera breve la tecnología disponible para el estudio de las variaciones conocidas o desconocidas en la secuencia de ADN y la técnica de secuenciación como prueba de oro para identificar y confirmar la variación génica. Nuevas tecnologías de secuenciación masiva como pirosecuenciación o secuenciación por síntesis y resecuenciación mediante microarreglos están emergiendo para disminuir los costos y tiempo de secuenciación. Debido a los avances de estas

tecnologías, actualmente un nuevo formato de secuenciación (SFF), adicional al aprobado para el método de Sanger, es aceptado por el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para medir las variaciones en la secuencia del ADN a lo largo del genoma, pueden utilizarse los métodos AFLP (amplified fragment length polymorphisms), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), RFLP (restriction fragment length polymorphisms), análisis de microsatélites y análisis de minisatélites. Las técnicas aplicadas a un gen específico para detectar mutaciones conocidas, como en el caso de diagnóstico de enfermedades o la búsqueda de nuevas mutaciones, utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), apoyándose con detección fluorescente, hibridación, electroforesis y cromatografía.

Herramientas moleculares para detectar variación en genomas

AFLP

Marcadores genéticos dominantes pueden ser monitoreados de manera codominante, utilizan la reacción de PCR para tamizar de manera rápida y eficiente la diversidad genética. Debido a su alta reproducibilidad y facilidad de uso, tienen una gran aplicación en sistemática, patotipificación, genética de poblaciones, mapeo de genes (*loci*) con características cuantitativas (QTL), huella o perfil específico de ADN.

RAPD

Marcadores genéticos dominantes, homocigotos, reproducibilidad sujeta a procedimientos estrictos. No requiere información previa del genoma, utiliza iniciadores universales y una pequeña cantidad de ADN. Se aplica en el desarrollo de mapas genéticos, mapeo de características específicas en poblaciones, huella de ADN, análisis de germoplasma, distancias genéticas entre individuos y estimaciones relativas de contribuciones parentales entre individuos.

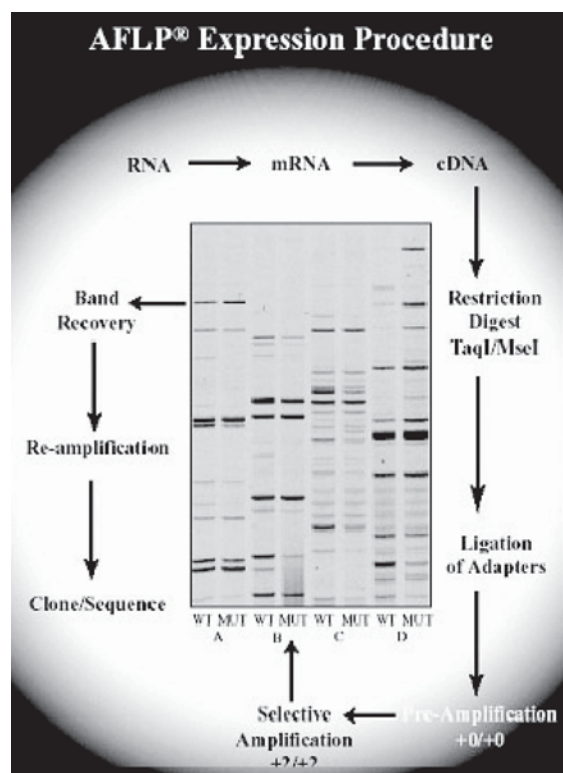


Fig. 1. Diagrama de flujo para el desarrollo de la técnica de AFLP's

Ralph

Esta técnica se utiliza mucho para analizar un número moderado de muestras con baja cantidad de resolución, también para mapeo de genes en mamíferos y plantas. Son marcadores genéticos codominantes, y pueden o no requerir información de la secuencia de ADN, pueden utilizarse para detectar mutaciones conocidas.

Ecotilling

Es un método similar al Tilling (targeting induced local lesions in genomes). De alto rendimiento para detectar SNP. No utiliza mutágenos químicos para inducir mutaciones, sino el principio de formación de heterodúplex y corte enzimático en la posición del cambio nucleótido, con monitoreo fluorescente, utilizada para el descubrimiento de SNP en humanos y plantas.

Análisis de secuencias repetidas, localizadas a lo largo del genoma

Análisis de minisatélites (MVR)

Los minisatélites son *loci* de ADN polimórfico que se encuentran a lo largo de todo el genoma. Son secuencias de 9 a 100 pb repetidas hasta 1000 veces. Se han usado para pruebas de identificación individual, pedigrí, análisis de ligamiento, mejoramiento de plantas, estudios poblacionales, huella de ADN; además para marcadores genéticos en enfermedades como brucelosis, incluyendo cáncer y mutación en células germinales. El análisis puede realizarse mediante digestión sencilla del ADN con enzimas de restricción, registrando el patrón de bandas características mediante electroforesis en gel.

Microsatélites

Son repeticiones de secuencia simple (SSR) o repeticiones de secuencia corta (STR), de 1 a 6 pb, presentan alto nivel

de heterocigotos, herramientas útiles para diagnóstico de enfermedades, pruebas de identidad y forense, estructura poblacional, son altamente polimórficos y fáciles de analizar. Pudiera decirse que el uso de microsatélites ha revolucionado el análisis genético. Las pruebas actuales de paternidad e identidad de humanos se basan en el análisis de microsatélites.

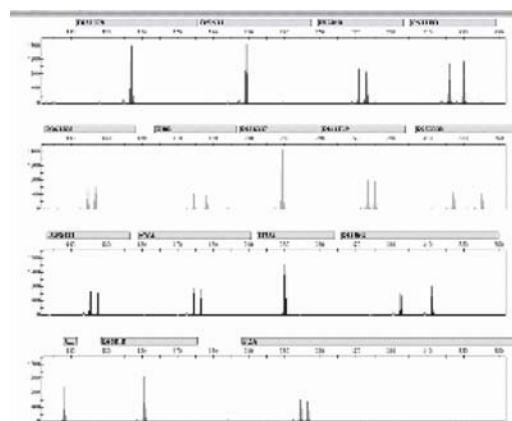


Fig. 2. Uso del análisis de microsatélites para determinar paternidad.

Herramientas para la búsqueda y confirmación de nuevas mutaciones

Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP)

Método utilizado para separar las cadenas de polinucleótidos (nativas y mutadas), en geles no desnaturizantes, se analiza la movilidad electroforética que depende de la secuencia del fragmento y la posición de la mutación. El fragmento de ADN se amplifica por PCR y debe ser menor de 400 pb, que haya una buena detección de los cambios en la secuencia. Las condiciones de análisis se optimizan de acuerdo al fragmento de ADN, el método es laborioso pero se reportan modificaciones para automatizarlo mediante electroforesis capilar.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Las moléculas de ADN, hasta con un nucleótido diferente, pueden separarse mediante electroforesis en geles con

gradiente de concentración de un agente desnaturizante como la urea o formamida. La técnica fue originalmente diseñada para detectar mutaciones puntuales en muestras clínicas, se utiliza para medir la diversidad molecular de poblaciones microbianas y otros organismos, a diferencia de la técnica de SSCP, DGGE puede distinguir variaciones en fragmentos de ADN de 1a2 kb.

Análisis heterodúplex (HDA)

Puede utilizarse en conjunto con el análisis de SSCP para lograr detectar variaciones que no se distinguen mediante SSCP. Útil para diferenciar la movilidad electroforética inducida por un anillo (*loop*) y para la detección de mutaciones en ADN mitocondrial.

Rompimiento químico o enzimático

Esta metodología se utiliza cuando se desea romper en el punto de cambio del nucleótido; para analizar posteriormente el tamaño y secuencia de los fragmentos, se usan nucleasas y compuestos químicos como el tetróxido de osmio, permanganato de potasio e hidroxilamina. Se utiliza para descubrimiento de nuevas mutaciones o diagnóstico de mutaciones conocidas.

Detección de mutaciones puntuales: ARMS (Amplification refractory mutation system)

Por su especificidad, se ha aplicado en diagnósticos de cáncer, se basa en el uso de iniciadores con el oligonucleótido involucrado en el cambio, lo que permite que se lleve a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el ensayo consiste en realizar dos pruebas complementarias de PCR y la presencia o ausencia del producto de PCR indica el genotipo de la muestra.

Cromatografía en condiciones desnaturizantes (DHPLC)

Es un método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento, aplicado a la detección de variaciones en fragmentos menores de 1000 pb, los avances en esta tecnología permiten la automatización y procesamiento de mayor cantidad de muestras en menor tiempo que los métodos en gel DGGE y SSCP. Algunas aplicaciones de la técnica de DHPLC incluyen la discriminación alélica, mapeo de genes, análisis de microsatélites, cuantificación de expresión génica, aislamiento de clonas para secuenciación, análisis mutacional de genes candidato. Este tipo de cromatografía requiere del uso de columnas especiales que distingan el heterodúplex y realicen la separación por tamaño de los fragmentos de polinucleótidos. Un requisito importante para la identificación de mutaciones es la optimización del gradiente de temperatura y solventes, aunque algunas aplicaciones manejan condiciones isocráticas e isotérmicas. Al igual que otros métodos se requiere de secuenciación para la confirmación o identificación de mutaciones.

Ligación de oligonucleótidos (OLA)

Técnica utilizada para obtener una mayor especificidad en la detección de mutaciones que la obtenida en ensayos normales de una sonda, su especificidad radica en el uso de dos sondas que alinean muy cerca una de otra en el ADN para después ligarse. Este método utiliza varios pares de sondas y para volverse múltiple y detectar diferentes alelos. Varias mutaciones puntuales se han detectado de manera múltiple, como en la enfermedad de fibrosis quística, en el gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*, en individuos positivos al subtipo HIV-1, en la genotipificación del gen miostatina.

Secuenciación

Los procedimientos de secuenciación de ADN más utilizados se basan en el método enzimático descrito por Sanger, en 1977. Aplicaciones derivadas de la secuenciación son: la comparativa, los diferentes tipos de genotipificación como AFLP, estudios de paternidad, búsqueda y validación de mutacio-

nes, descubrimiento y validación de SNP, identificación de microorganismos basada en secuencias específicas y otros polimorfismos.

Metodología utilizada para confirmar y buscar nuevas mutaciones, método molecular de alta resolución, caro por la inversión inicial en equipo, pero muy recomendado por la exactitud de sus resultados. Una técnica de secuenciación para determinar variaciones nucleótidas es el SNPshot (Applied Biosystems), mediante el cual se detectan a lo largo de la secuencia del ADN los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Otras aplicaciones en el estudio de mutaciones son la investigación clínica, forense, secuenciación de genomas, diagnóstico molecular, fármaco-genómica y pruebas de paternidad. El uso de las herramientas moleculares para estudiar la variación genética y la secuenciación del genoma humano y de otros organismos ha permitido desarrollos biotecnológicos a nivel de genética humana, animal y vegetal, y se ha logrado explicar con mayor detalle la biodiversidad y procesos evolutivos.

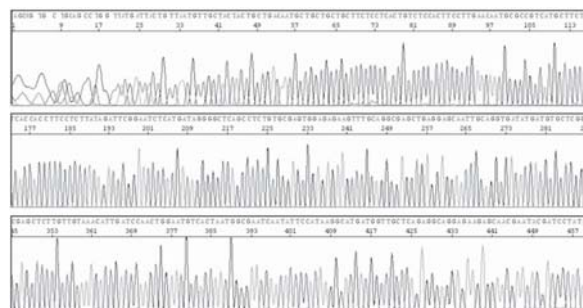


Fig. 3. Electroferograma de una reacción de secuenciación con cuatro fluorocromos.

Referencias

1. Taylor G. R. 1997. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. CRC Press USA.
2. Frayling I.M. 2002. Methods of molecular analysis: mutation detection in solid tumours. J Clin Pathol: Mol Pathol. 55:73-79.
3. Yan H and Zhou W. 2004. Allelic variations in gene expression. Current Opinion in Oncology. 16:39-43
4. Anollés C.G., Gresshoff M.P., 1997. DNA markers: protocols, applications, and overviews. Library of Congress. USA.